

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Expresión de citoquinas pro inflamatorias de leucocitos  
de alpaca (*Vicugna pacos*) inducidos por el extracto de  
macroquistes de *Sarcocystisaucheniae***

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

**AUTOR**

**Rocío Luz Hinostroza Solano**

**Lima – Perú**

**2012**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis padres que me ayudaron a realizarme como persona y profesional, a mi hermano que es mi ejemplo a seguir y a Dios por todo lo que me da.

### **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la FMV-UNMSM, en especial al M.V. Alberto Manchego Sayány M.V. Kim Lam Chiok que me apoyaron en todo momento para la realización de esta tesis, por lo que les agradezco profundamente.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>I.- INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1.- Citoquinas.....	3
2.2.- <i>Sarcocystis</i> sp.....	4
2.3.- Reacción en Cadena de la Polimerasa transcriptasa reversa en tiempo real (RT-PCR).....	5
<b>III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1.- Animales.....	23
3.2.- Obtención de muestras.....	24
3.3.- Procedimiento.....	24
3.4.- PCR tiempo real.....	26
3.5.- Electroforesis de los productos de RT-PCR.....	28
3.6.- Cuantificación relativa de los productos de RT-PCR Tiempo Real (citoquinas).....	29
3.7.- Análisis estadístico.....	30
<b>IV.- RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>V.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>VI.- CONCLUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA CITADA.....</b>	<b>51</b>
<b>VIII. APÉNDICE.....</b>	<b>58</b>

## RESUMEN

El objetivo principal del trabajo fue determinar la expresión de distintas citoquinas proinflamatorias por los leucocitos circulantes de alpaca, al enfrentamiento antigénico de extracto de macroquistes de *Sarcocystisaucheniae* a diversas dosis y tiempos de exposición. Los leucocitos en una concentración de 500 000 cel/ml fueron expuestos a concentraciones de 0.5, 1, 50, 500 y 1000 ng de extracto de macroquistes de *Sarcocystisaucheniae* e incubados en placas de cultivo por 1, 12 y 24 horas. Posteriormente se extrajo los ARN mensajeros (ARNm) totales de cada tratamiento utilizando Trizol, que se utilizaron para realizar la RT-PCR tiempo real empleando cebadores específicos de Interleuquinas (ILs): IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ . Finalmente, se observó que los niveles de ARNm de IL 1 $\alpha$  y TNF $\alpha$  generados a la hora eran detectables y comparativamente elevados con respecto al calibrador (leucocitos no expuestos a extracto). La IL 1 $\beta$  se encontró incrementada en la concentración de 1 ng/ml a 24 horas, mostrandouna cinética de expresión negativa en comparación con el control no tratado. IL-6 no se evidenció mediante RT-PCR tiempo real. Además se realizó la observación de viabilidad leucocitaria a los tiempos de 1, 12 y 24 horas permitiendo corroborar el efecto tóxico del extracto de macroquistes de *S. aucheniae* a altas concentraciones. Se concluye que el extracto de *Sarcocystisaucheniae* induce una respuesta inflamatoria tóxica sobre los leucocitos de alpaca con expresión de las interleuquinas detectadas.

**Palabras clave:** *Sarcocystisaucheniae*, Interleuquinas, pro inflamatorias, alpaca

## ABSTRACT

The main aim of this research was to determine the expression of several leukocytes proinflammatory cytokines from alpaca to the antigenic confrontation of *Sarcocystisauchenia* macrocysts extracts at various doses and different exposure times. Leukocytes in a concentration of 500 000 cells / ml were exposed to concentrations of 0.5, 1, 50, 500 and 1000 ng of *Sarcocystisauchenia* macrocysts extracts and were incubated in culture dishes for 1, 12 and 24 hours. The total messenger RNA (mRNA) were extracted for each treatment using Trizol, which were used to perform real-time RT-PCR using specific primers for interleukins (ILs), IL-1 $\alpha$  and  $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . It was observed that the generated mRNA level of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  in the first hour were detectable and higher in comparison to the calibrator (leukocytes were not exposed to extract). IL-1 $\beta$  was found increased in a concentration of 1 ng / ml at 24 hours, what it means that there is a negative kinetic expression compared with the untreated control group. IL-6 was not evidenced by RT-PCR real time. In addition, the observation about the leukocytes viability times at 1, 12 and 24 hours corroborated the toxic effect of the macrocysts extract of *S. aucheniae* at high concentrations. It is concluded that the extract of *Sarcocystisauchenia* induces an inflammatory response with expression of detected interleukins.

**Keywords:** *Sarcocystisauchenia*, interleukins, pro-inflammatory, alpaca

## INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

I.- Tabla N° 1 Características del parásito.....	12
II.- Tabla N° 2 Oligonucleótidos IL1, IL 6 y TNF $\alpha$ .....	27
III.- Figura N° 1 Electroforesis GAPDH.....	31
IV.- Figura N° 2 Temperatura de disociación GAPDH.....	32
V.- Figura N° 3 Electroforesis IL 1 $\alpha$ .....	33
VI.- Figura N° 4 Temperatura de disociación IL 1 $\alpha$ .....	33
VII.- Figura N° 5 Temperatura de disociación IL 1 $\beta$ .....	34
VIII.- Figura N° 6 Electroforesis IL 6.....	35
IX.- Figura N° 7 Electroforesis TNF $\alpha$ .....	36
X.- Figura N° 8 Temperatura de disociación TNF $\alpha$ .....	37
XI.- Grafico N° 1 Expresión relativa IL 1 $\alpha$ .....	38
XII.- Grafico N° 2 Expresión relativa IL 1 $\beta$ .....	39
XIII.- Grafico N° 3 Expresión relativa TNF $\alpha$ .....	40
XIV.- Grafico N° 4 Expresión relativa IL 1 $\alpha$ tiempo vs dosis.....	42
XV.- Grafico N° 5 Expresión relativa TNF $\alpha$ tiempo vs dosis.....	42
XVI.- Grafico N° 6 Expresión relativa IL 1 $\beta$ tiempo vs dosis.....	43
XVII.- Grafico N° 7 Porcentaje de células vivas post tratamiento.....	42
XVIII. Anexo N°1.....	56
XIX. Anexo N°2.....	57
XX. Anexo N°3.....	58
XXI. Anexo N°4.....	59
XXII. Anexo N°5.....	60
XXIII. Anexo N°6.....	61

XXIV. Anexo N°7.....	62
XXV. Anexo N°8.....	63



## I. INTRODUCCION

Las alpacas son animales emblemáticos de nuestro país, siendo su crianza un soporte económico del poblador alto-andino del país. Las enfermedades infecciosas (bacterianas y parasitarias) que sufren estos animales, son un freno para el desarrollo de la ganadería alpaquera por la muerte de animales, disminución en la productividad o desmedro de sus productos (carne y fibra). Una de la parasitosis mas prevalente en las alpacas y llamas del Perú es la sarcocystiosis, que a pesar de no causar la muerte del animal produce una gran merma en la calidad de la carne y limita la venta y consumo de ella. Es por esto que la sarcocystiosis es de gran importancia en el país, ya que la mayoría adultos se encuentran infectados.

Por otro lado, los mecanismos de infección parasitaria por *Sarcocystis aucheniae* son conocidos, sin embargo, se desconoce la forma de estimulación al sistema inmune de los camélidos, ni como son reconocidos sus antígenos. Los extractos de macroquistes de *S. aucheniae* han demostrado contener proteínas con poder tóxico, como la sarcocystina, que produce alteraciones de distintas severidades en los tejidos digestivo y nervioso de los consumidores de estos quistes, existiendo especies animales susceptibles y otros más resistentes a estas toxinas. Además es importante mencionar que La Perle encontró en un estudio en 1999, que los hospederos intermediarios presentaban miositis eosinofílica; mientras que otros autores mencionan una adaptación al parásito sin ninguna lesión evidente. Por tanto, se pretende saber si existe una respuesta inicial (pro inflamatoria) de los leucocitos de alpaca al enfrentamiento antigénico de extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* a diversas dosis (0.5, 1, 50, 500 y 1000 ng.) y a diversos tiempos de exposición (1, 12 y 24 horas), para detectar la expresión de distintas citoquinas proinflamatorias; que fueron detectadas con cebadores (primers) específicos de Interleuquinas (ILs): IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  (Odbileg, 2005) para realizar la prueba de reacción en cadena de la polimerasa reversa en tiempo real (RT-PCR real time). Con el objetivo principal de evidenciar la expresión de interleuquinas proinflamatorias por leucocitos circulantes de alpaca, para el conocimiento básico del tipo de respuesta inmunológica del hospedero intermediario.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1.- CITOQUINAS:**

Son proteínas secretadas por las células del sistema inmunitario que regulan las inmuno reacciones al enviar señales entre células. Estas tienen varias características como por ejemplo el efecto en una gran variedad de células y tejidos, además que tienen actividad redundante, puesto que muchas de ellas presentan efectos similares (Tizard, 2002). En los camélidos existe poca información concerniente a su sistema inmune, así como la acción de las citoquinas que son importantes moléculas en el mantenimiento del balance fisiológico e inmunomodulación. La detección de citoquinas en el estado de una enfermedad puede ser útil para su diagnóstico, debido a que intervienen en la diferenciación de células T (Odbileg, 2004).

#### **2.1.1.- Tipos**

**2.1.1.1.-** Citoquinas producidas principalmente por macrófagos: Interleuquina 1(IL-1), Interleuquina 6 (IL-6), Interleuquina 12 (IL-12), Interleuquina 18 (IL-18) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Su producción es activada por una gran variedad de estímulos, como bacterias y sus productos como endotoxinas, leucotrienos, componentes activados del complemento, inmunocomplejos, señalización de linfocitos T, TNF $\alpha$ , GM-CSF y la propia IL-1.

**2.1.1.2.-** Citoquinas producidas principalmente por linfocitos T:

a) Citoquinas de linfocitos Th1: Interleuquina 2, Interferón gamma, Factor de necrosis tumoral beta (linfotóxina alfa).

b) Citoquinas de linfocitos Th2: Interleuquina 4, Interleuquina 5, Interleuquina 9, Interleuquina 10, Interleuquina 13, Interleuquina 17.

**2.1.1.3.-** Citoquinas producidas por neutrófilos: Quimiocina CXC, Quimiocina CC.

**2.1.1.4.-** Citoquinas antivirales: Interleuquina 16.

**2.1.1.5.-** Factores de crecimiento

### 2.1.2.- Descripción de las citoquinas/Interleuquinas de interés:

Nombre	PM (kDa)	Producido principalmente por	Blancos principales
IL-1	17	Macrófagos	Linfocitos Th2, B
IL-6	26	Fibroblastos, Linfocitos T	Linfocitos B
TNF $\alpha$	17	Macrófagos	Tumores

### 2.1.3.- Función

Las citoquinas son proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación celular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Algunas citoquinas son producidas por diversos tipos celulares, como IL-1, IL-6, IFN-  $\alpha$  y  $\beta$  y TNF $\alpha$ . Otras son por muy pocos, como IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5 (Tizard, 2002).

### 2.1.4.- Regulación

Se regulan de diversas formas: por control de la expresión de los receptores, por proteínas de enlace específicas y por otras citoquinas que ejercen efectos opuestos, como por ejemplo las acciones de la IL-1 son reguladas por las actividades antagonistas del receptor (IL-1 RA). La IL-1 RA es una forma de IL-1 activa. Otro mecanismo es la adherencia de citoquinas a proteínas de unión específicas presentes en los líquidos corporales. Estas proteínas suelen ser receptores solubles y se han identificado receptor soluble para varias Interleuquinas como IL-1 y IL-6. En la mayor parte de los casos estos receptores solubles actúan de manera antagónica reduciendo la unión de citoquina a receptor de superficie celular. En otros casos el complejo citoquina-receptor es biológicamente activo. Este es el caso de IL-6. Las cadenas IL-6 R $\alpha$  solubles forman un complejo con IL-6 para generar una estructura de actividad biológica.

Citoquinas como IL-1 se unen en el tejido conectivo a glucosaminoglucanos como heparina o CD44, de esta forma sirven como reservorio de moléculas fácilmente disponibles. Una de las maneras principales de regulación de funcionamiento de las citoquinas es a través de efectos opuestos de diferentes citoquinas (Tizard, 2002).

### **2.1.5.- IL-1**

Posee tres isoformas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1RA. La fuente principal se encuentra en los macrófagos activados, pero además son producidos por las células de Langerhans, linfocitos T, B y NK, endotelio vascular, fibroblastos y queratinocitos. IL-1 actúan en linfocitos T, B y NK, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos y monocitos. IL-1  $\beta$  se produce como una proteína grande que debe ser fragmentada por la enzima convertidora de IL-1  $\beta$  para transformarse en una molécula activa. Las IL-1  $\alpha$  y  $\beta$  son los principales coestimuladores de linfocitos Th2. También estimulan la respuesta de la fase aguda. IL-1RA es biológicamente inerte (Tizard, 2002).

La Interleucina-1 (IL-1) es un miembro importante del grupo de las citoquinas pro inflamatorias. Pertenece a una super familia de citoquinas relacionadas que lleva su nombre, de las cuales se conocen tres agonistas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18) y un antagonista del receptor (IL-1Ra). Las acciones biológicas de la IL-1 se basan en la inducción de genes que codifican para la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2), la fosfolipasa A tipo 2 (PLA2) y la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). Las consecuencias biológicas de esta inducción se traducen en una franca respuesta inflamatoria. La IL-1 se une a dos receptores específicos, cuando lo hace con el receptor tipo I (IL-1RI) desencadena una vía de señalización intracelular que incluye la fosforilación proteica mediada por quinasas conocidas como IRAKs (quinasas asociadas al receptor de IL), y que es responsable de los efectos biológicos de la citoquinas. Por otro lado, la unión al receptor tipo II (IL-1RII) no desencadena ninguna señal. Los genes de la mayoría de los miembros de la familia de IL-1 se encuentran localizados en el brazo largo del cromosoma 2.

#### **Estructura proteica y secreción**

La producción de la IL-1 es inducida por productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) y otras citoquinas como el TNF, la IL-2, la IL-3, la IL-12, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células

madre y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Otros inductores no microbianos de la secreción de IL-1 son: factores de injuria tisular (hiperosmolaridad, isquemia), sustancias neuroactivas (sustancia P, anfetaminas), moléculas inflamatorias (PCR,  $\alpha$ -1-antitripsina, cristales de urato y de pirofosfato de calcio), factores de la coagulación (plasminógeno, trombina), lípidos (factor activador de plaquetas, LDL oxidadas) y algunos medicamentos como anfotericina-B, bleomicina y colchicina, entre otros. (Dinarelli, 1996)

La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  son sintetizadas como precursores sin secuencia líder, es decir, que carecen de una secuencia guía para definir la localización final del producto de la traducción ribosomal. El peso molecular de cada precursor es 31 kDa. A diferencia de IL-1Ra, el procesamiento de IL-1 $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  hacia formas “maduras” de 17 kDa requiere de proteasas celulares específicas.

El precursor de la IL-1 $\alpha$  (proIL-1 $\alpha$ ) tiene 271 aminoácidos y es sintetizado en los ribosomas asociados a estructuras del citoesqueleto (microtúbulos), a diferencia de la mayoría de proteínas que son traducidas en el retículo endoplasmático. ProIL-1 $\alpha$  es biológicamente activa y permanece en el citosol debido a la falta de un péptido señal. Intracelularmente, proIL-1 $\alpha$  parece actuar a través de una señal de localización nuclear que se encuentra entre los residuos de la región precursora. En la superficie celular, IL-1 $\alpha$  se encuentra unida a la membrana mediante una lisina miristoilada en la región pro, esto ocurre tanto adentro como en la superficie celular. Cuando las células mueren se libera pro-IL1 $\alpha$ , que puede ser clivada por proteasas extracelulares. La forma madura de 159 aminoácidos también se puede producir por acción de enzimas asociadas a la membrana y dependientes de calcio, llamadas calpainas. A diferencia de la IL-1 $\beta$ , la IL-1 $\alpha$  no se encuentra en la circulación ni en los fluidos corporales, excepto durante condiciones patológicas. (Dinarelli, 1999)

Después de ser sintetizada, la IL-1 $\beta$  permanece primariamente en el citosol hasta ser cortada y transportada fuera de la célula. La proIL-1 $\beta$  debe ser procesada por la enzima convertidora de IL1- $\beta$  (ICE), también conocida como caspasa-1, para ser funcional. La caspasa-1, además, está implicada en procesos de apoptosis. La propieza de IL-1 $\beta$  (aminoácidos 1-116) también está miristoilada en los residuos de lisina, pero a diferencia de la IL-1 $\alpha$ , la proIL-1 $\beta$  no tiene forma de membrana y es sólo marginalmente activa. La liberación de IL-1 $\beta$  madura parece estar asociada al clivaje entre los residuos de ácido aspártico-alanina (aminoácidos 116-117) por la ICE. Existen al menos cinco isoformas de ICE (ICE $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ); ICE $\alpha$  está implicada en el autoprosesamiento del precursor de ICE y de proIL-1. La liberación de IL-1 $\beta$  madura, también requiere de la acción de ICE. El precursor de IL-1 $\beta$  puede ser encontrado a nivel extracelular en modelos murinos con inhibidores específicos de la ICE. Se cree

que la pro-IL1 $\beta$  es liberada durante la muerte celular y es procesada por proteasas extracelulares (gelatinasa-B, metaloproteinasas) dando lugar a la forma madura biológicamente activa. (Vélez, *et al.* 2004)

#### **2.1.6.- IL-6**

La IL-6 es una citoquina que fue identificada inicialmente en el sobrenadante de cultivos de células mononucleares, las cuales habían sido estimuladas con mitógenos o antígenos, encontrando como su primera función que inducía la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B transformados. Durante su estudio, se le ha denominado de diversas maneras, dependiendo las funciones en que participaba. Así, se ha llamado como Factor Estimulante de Hepatocitos (HSF>, Factor-2 Estimulante de Células 6 (BSF-2), Interferón 2 (IFN-2), Proteína de 26kDa, Factor de Crecimiento de Hibridoma-Plasmocitoma (HPGF), Proteína Inductora de Diferenciación de Células Mieloides Sanguíneas (MGI-2A). Se trata de una citoquina que participa en múltiples procesos, por lo que se dice que es multifactorial o pleiotrópica. Entre sus múltiples funciones, se ha encontrado que actúa en la hematopoyesis, donde incrementa la proliferación del progenitor hematopoyético pluripotencial, la respuesta inmune, donde participa en la regulación de los linfocitos (T y B) y en la respuesta de la inmunidad celular, y en la respuesta de fase aguda, donde es la principal inductora de la misma. Además, participa en la respuesta inflamatoria, en la infección localizada en cavidad peritoneal o sistémica en el metabolismo óseo, en el crecimiento de algunas líneas de linfomas, y en otros efectos. (Santiago, 1995)

#### **Estructura del gen y la proteína.**

El gen de la IL-6 humana está localizado en el brazo corto del cromosoma 7 p15-p21, y la IL-6 murina en la región proximal del cromosoma 5; ambas constan de 5 exones y 5 intrones. Se han encontrado tres sitios de iniciación para la transcripción que son utilizados en distintos tipos celulares. En el límite E' del gen de la IL-6, entre -225 y -113, existen motivos similares a los elementos reguladores del gen c-fos humano y pueden contener los elementos de actuación cis, los cuales son los principales responsables para la activación del promotor IL-6.

El RNAm de 1.3kb se traduce a una proteína precursora de 212 aminoácidos, con una masa molecular de 26kDa. Después de remover un péptido de señal de 28 aminoácidos, la proteína resultante de 184 aminoácidos contiene dos sitios posibles de N-glicosilación, siendo N- y O-glicosilada y subsecuentemente secretada. Aunque la IL-6 no glicosilada es biológicamente activa, esas modificaciones post-translacionales pueden tener un papel en las funciones específicas de la citoquina en los tejidos, o en su vida media. (Santiago, 1995)

Esta Interleuquina es producida por macrófagos activados, linfocitos T y B, células del estroma de la médula ósea, células del endotelio vascular, fibroblastos, queratinocitos y células del mesangio. Actúa en linfocitos T y B, hepatocitos y células del estroma de la médula ósea. La IL-6 promueve la producción de IL-2 y IL-2R y la diferenciación de los linfocitos T. Participa en la maduración final de los linfocitos B en células plasmáticas. Actúa como cofactor de la IL-1 en la síntesis de IgM, y de IL-5 en la síntesis de IgA. Además tiene un cometido importante en estimular la reacción de fase aguda (Tizard, 2002).

Esta citoquina producida por Th2, pertenece al grupo mayor de citoquinas anti-inflamatorias, cuyo principal rol es el de inhibir la síntesis de IL-1, TNF $\alpha$  y otras citoquinas pro-inflamatorias mayores (Opal, 2000). Además es considerada como una citoquina pro-inflamatoria inducida por LPS junto con TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y a menudo se utiliza como marcador de la activación sistémica de las citoquinas pro-inflamatorias (Barton, 1997).

Como otras citoquinas la IL-6 tiene propiedades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. De manera que como anti-inflamatorio es un potente inductor de la respuesta de la proteína de la fase aguda. Estudios recientes a partir de ratones knockout, han demostrado que la Interleuquina 6, actúa principalmente como citoquina anti-inflamatoria (Libert, 1997 y Xiug, 1998) y atenúa la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias con reducido efecto sobre la síntesis de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ . Además, IL-6 induce la síntesis de glucocorticoides (Ruzek, 1997).

#### **2.1.7.- TNF $\alpha$**

Es un homotrímero secretado por macrófagos, linfocitos T y B y fibroblastos, actúa en casi cualquier célula nucleada. Se le encuentra en forma soluble o unida a la membrana. Es un mediador de muchas funciones inmunitarias e inflamatorias, y regula la proliferación de muchos tipos celulares.

También activa los macrófagos para incrementar su propia síntesis junto con la IL-1, IL-6, M-CSF y G-CSF. Tiene la capacidad de iniciar la apoptosis en algunas células tumorales (Tizard, 2002).

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF) es una citoquina pleotrópica que posee propiedades reguladoras, inmunitarias, inflamatorias, antitumorales y que actúa en estrecha coordinación con otras citoquinas como la Interleucina-1 y el interferón- $\gamma$ . Además de su función inflamatoria y antitumoral se conoce su influencia en la mitogénesis, diferenciación e inmunorregulación de diferentes tipos celulares, lo que sugiere un importante papel de esta citoquina en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas reguladoras producidas por el sistema inmune. Poseen un amplio espectro de efectos en procesos reparadores e inflamatorios. Su pleiotropía se debe a que una citoquina dada puede tener múltiples efectos a nivel del sistema inmune, el desarrollo y la diferenciación celular. Además, sus efectos pueden solaparse por inducir cada una la producción de otras a través de una cascada de efectos. Su acción varía con la concentración. Así, a bajas concentraciones, el TNF cumple funciones homeostáticas, como la reparación tisular, mientras que a altas provoca daño endotelial, microtrombosis y daño tisular. El TNF es un polipéptido de bajo peso molecular derivado principalmente de los monocitos y macrófagos activados y de los linfocitos T. También puede ser producido por linfocitos B, mastocitos, células asesinas naturales (NK), queratinocitos, y algunas células tumorales. Las células de Kupffer (macrófagos hepáticos), probablemente constituyen la principal población de macrófagos corporal, siendo la principal fuente de síntesis de TNF. El TNF se produce en respuesta a estímulos exógenos y endógenos, siendo el más potente la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido. Esta actúa a nivel de proteínas de la superficie de los macrófagos, que interactúan induciendo la transcripción del gen del TNF. (Solíz, 1997)

### **Estructura del TNF- $\alpha$**

La glicoproteína TNF- $\alpha$  madura se encuentra expuesta en la superficie de la membrana celular, contiene 233 aminoácidos, pesa 26 kDa, es biológicamente activa y participa en la citotoxicidad e inflamación por interacción celular (Dinarello, 1999). El TNF- $\alpha$  soluble corresponde a una proteína de 17 kDa, conformada por 157 aminoácidos, producida a partir del TNF- $\alpha$  de membrana, el cual es procesado por cortes a nivel del residuo 76 por acción de la enzima convertidora del TNF- $\alpha$  (TACE), una metaloproteína que está también en la membrana celular. Estudios cristalográficos muestran que el TNF- $\alpha$  está conformado por tres monómeros asociados no covalentemente y cuyo extremo N-terminal



se encuentra expuesto en la superficie. Esta fracción N-terminal no parece importante en la interacción con el receptor (TNFR) (Callard, 1994).

### **2.1.9.- IL-1, IL-6, TNF $\alpha$**

Las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ , son los principales mediadores de la inmunidad innata contra bacterias gram positivos y son los mediadores claves de la respuesta inflamatoria y al shock séptico (Okada, 1999). Además, estas citoquinas son multifuncionales y conocidas como activadores de linfocitos y macrófagos (Akira, 1990 y Dinarello, 1992).

Estas Interleuquinas en camélidos, se encuentran cercanamente relacionadas a las estructuras de cDNAs de otras especies como camellos, cerdos, cabras, ovejas y caballos. Es probable que estas similitudes también se den para la regulación de producción, así como para sus roles inmunorreguladores (Odbileg, 2005).

## **2.2.- SARCOCYSTIS**

### **2.2.1.- Clasificación taxonómica**

Phylum APICOMPLEXA Levine, 1986

Clase SPOROZOASIDA Leuckart, 1879

Subclase COCCIDIASINA Leuckart, 1879

Orden EUCCOCCIDIORIDA Léger y Duboscq, 1910

Suborden EIMERIORINA Léger, 1911

Familia SARCOCYSTIDAE Poche, 1913

Subfamilia SARCOCYSTINAE Poche, 1913

Género SARCOCYSTIS Lankaster, 1882

### 2.2.2.- Tipos

*Sarcocystis* parasita a los camélidos sudamericanos y fueron descritos por primera vez en llamas (Brumpt, 1913); las especies que parasitan a estos, son tres: *Sarcocystis aucheniae* que produce macroquistes de crecimiento y maduración lenta en la musculatura esquelética en alpacas, llamas y vicuñas, *Sarcocystis lamacanis* que produce microquistes que son infectivos en corto tiempo ubicados en la musculatura miocárdica y esquelética de llamas y alpacas (Leguía et al. 1989) y *Sarcocystis tilopodi* que se reportó en guanacos de Argentina (Quiroga et al. 1969).

### 2.2.3.- Ciclo

Los miembros de este género son protozoos intracelulares obligatorios, y como una típica coccidia, su ciclo de vida consiste en merogonia, gametogonia y esporogonia (Tender, 1995). El *Sarcocystis* spp., al ser de ciclo indirecto, requiere de dos hospedadores obligatorios. Realizando el estadio sexual en el predador (hospedador definitivo) y el estadio asexual en la presa (hospedador intermediario) (Leguía et al., 1989).

El parásito vive y se reproduce sexualmente en el intestino del perro (hospedador definitivo), quien elimina grandes cantidades de esporoquistes en las heces, dependiendo de la especie de *Sarcocystis* y de la evolución de la infección en el perro. La eliminación continúa por un periodo de 4 a 8 semanas, posterior a lo cual ocurre una recuperación espontánea (White, 1998).

El hospedador definitivo desarrolla la fase enteroepitelial o intestinal (Rojas, 1993) al alimentarse de un animal (presa) o carne infectada con sarcoquistes: los bradizoitos son liberados por la digestión de los quistes en el estómago e intestino del predador, se mueven activamente e ingresan a la pared intestinal donde se dividen en gametos femenino y masculino (reproducción sexual); posteriormente se produce la fecundación que tiene como resultando la producción de ooquistes (zigotes). El ooquiste, al poseer una membrana muy frágil, esporula en la lámina propia. Cada ooquiste contiene dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos; el esporoquiste es evacuado al exterior junto con las heces (Levine, 1986; Dubey et al., 1986; Soulsby, 1987; Rojas, 1990; Mehlhorn, 1993). El perro, usado por los productores de camélidos sudamericanos en el manejo del rebaño (Cordero del Campillo, 1999), es el hospedero definitivo del *Sarcocystis aucheniae* (Leguía et al., 1989) y responsable de la latencia e incidencia de la enfermedad. El hombre, gato y felinos silvestres, no transmiten la enfermedad (Leguía et al. 1989). En un estudio, Schneider et al., (1984), aislaron quistes

de *Sarcocystis aucheniae* de llama y lo suministraron a un perro y a un gato, sólo el perro eliminó esporoquistes a los 21 días de la inoculación y por 21 días.

El hospedador intermediario desarrolla la fase extra intestinal o tisular (Rojas, 1993), los camélidos sudamericanos adquieren la infección al ingerir pasturas o aguas contaminadas con los esporoquistes, que permanecen viables por meses en condiciones de humedad y bajas temperaturas (Leguía, 1999). Los esporoquistes ingeridos liberan los esporozoítos en el intestino, los que ingresan a la circulación sanguínea, dando lugar a 3 generaciones de esquizontes, que toman el nombre de merozoítos, observándose que son altamente móviles para entrar y salir de las células (Speer, 1986): la primera generación de esquizontes se desarrolla en las células endoteliales o subendoteliales de los vasos sanguíneos de casi todos los órganos, son de reproducción rápida por eso se llaman taquizoítos (Rojas, 1993). Los merozoítos producidos de la primera generación de esquizontes entran a nuevas células endoteliales y subendoteliales, vía sistema sanguíneo (Leguía, 1989) donde se realiza la segunda generación de esquizontes. La segunda generación de merozoítos entra a las células musculares esqueléticas, cardíacas y algunas veces también en las células del sistema nervioso central. Luego se realiza la tercera generación de esquizontes, que es la que finalmente termina conformando el quiste (sarcoquistes) que pueden ser microquistes y/o macroquistes, en cuyo interior se forman los bradizoítos y cistozoítos (merozoítos), de reproducción lenta. El quiste crece por proliferación de los parásitos mediante reproducción asexual (Alva, et al., 1981). El merozoito invade la célula muscular, se rodea de la pared quística y luego se transforma en la célula madre o metrocito. En el citoplasma del metrocito y después degenera la célula madre, este proceso se conoce como endodiogenia. Este tipo de reproducción asexual consecutiva produce cientos y cientos de cistozoítos dentro del quiste (Mehlhorn, et al., 1976; Scholtyseck, 1979; Erber, 1982; Speer, 1986; Dubey, 1986).

En infecciones naturales, es común que ambas especies (*S. lamacanis*, *S. aucheniae*) afecten al mismo tiempo al hospedero intermediario (White, 1998). Los microquistes se encuentran especialmente en el corazón y diafragma del hospedero intermediario, pero también en músculo esquelético; mientras que los macroquistes son blancos y del tamaño de granos de arroz pequeños y compactos, usualmente se encuentran en el esófago y cuello, pueden estar en cualquier parte del músculo esquelético pero nunca en el corazón (White, 1998).

Estos quistes (macro o micro) no ocasionan reacción inflamatoria alguna mientras se encuentran en el músculo, pero a medida que la concentración de quistes aumenta, estos pueden interferir con la eficiencia del músculo (White, 1998).

**Tabla N 1:** Características del parásito y su ciclo biológico.

CARACTERÍSTICAS	<i>S. aucheniae</i>
HOSPEDADOR DEFINITIVO (HD*)	Perros (también lobos)
PERIODO PREPATENTE (HD*)	11 – 20 días
PERIODO PATENTE (HD*)	20 – 41 días
ESPOQUISTES ELIMINADOS POR DÍA	Hasta 560000 (máximo 15 días post infección)
TAMAÑO DE ESPOROQUISTES	15.63 ± 0.47 x 10.84 ± 0.36 µm
SOBREVIVENCIA DE ESPOROQUISTES EN PASTURAS	Prolongada, puede ser de 4 – 5 meses o mayor.
VELOCIDAD DE MADURACIÓN DE LOS QUISTES (HI**)	Lenta, 14 – 18 meses
LOCALIZACIÓN PRINCIPAL DE LOS QUISTES (HI**)	Músculos esqueléticos, nunca al corazón.
TOXICIDAD EN PERROS Y HUMANOS AL CONSUMIR CARNE PARASITADA	Baja
TAMAÑO DE SARCOQUISTES MADUROS	Macroscópico 3 – 6 mm. X 1.5 – 2.5 mm.

\* HD: Hospedero definitivo.

\*\*HI: Hospedero indefinido.

#### 2.2.4.- Características del quiste:

El quiste genera una miositis eosinofílica diseminada asociada a macroquistes. El tamaño de los macroquistes varía, así como el espesor de la pared quística (Jensen, 1986). Los quistes están formados por una doble pared, una externa que generalmente presenta protrusiones llamadas vellosidades o papilas cuya diversidad morfológica ayuda a diferenciar las especies de *Sarcocystis* y

una pared interna de donde parten prolongaciones hacia el interior del quistes formando cavidades multiloculares donde se encuentran los bradizoitos (Melo, 1974). Además, las paredes quísticas están compuestas por vellosidades anastomosadas (La Perle et al., 1999). Estos quistes destacan en el músculo esquelético como formaciones esféricas y ovaladas de color blanco nacarado, de consistencia blanda y con dimensiones variables desde escasos milímetros hasta más de un centímetro, con apariencia de granos de arroz. Observados con microscopio óptico, los quistes presentan una pared quística radiada (Guerreo et al., 1967). Las observaciones de la ultraestructura del quiste, revelan que la pared quística está constituida por dos zonas de diferente densidad electrónica, presentando papilas cortas, en forma de lengua que penetran en el tejido muscular. En el interior de las papilas se ven unas estructuras finas equidistantes entre sí, que se disponen a lo largo de la papila. La zona interna tiene prolongaciones que se dirigen hacia el interior del quiste formando cavidades donde se encuentran cistozoitos (Melo, 1974).

En un estudio que tuvo el objetivo de determinar si el tamaño de los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* afectan la viabilidad y potencial biótico en los caninos domésticos, se utilizaron 24 cachorros cruzados de 2.5 meses de edad, con pesos promedio de 2.6 kg., debidamente desparasitados y alimentados con una dieta casera exenta de carnes. Se obtuvo macrosquistes de *S. aucheniae* del cuello de alpacas y llamas, clasificándolos en macroquistes grandes (>5 mm) y pequeños (1-3 mm). Diez cachorros fueron oralmente infectados con 500 macroquistes grandes (MG) y 12 cachorros con 500 macroquistes pequeños (MP), en ambos casos por dos días consecutivos. Además, 6 perros quedaron sin infectar como grupo control. Se recolectó diariamente muestras fecales a partir del 8° día post-infección y por un periodo de 22 días. Los resultados mostraron que animales infectados con MP presentaron una carga de esporoquistes 3.6 veces superior que aquellos infectados con MG; así mismo, el periodo prepatente promedio fue de 16.5 y 11.5 para los MG y MP, respectivamente (Cornejo, 2007).

Por otro lado, se cree que dentro del quiste de los *Sarcocystis spp.* existe una sustancia tóxica llamada Sarcocystina, dotada de propiedades antigénicas, esta sustancia es una poderosa neurotoxina (Hiepe et al., 1981). Los quistes ubicados en la musculatura liberan la toxina al romperse, pasando la toxina al torrente sanguíneo y así se propaga por todo el organismo, lo que producirá, entre otras lesiones abortos en el ganado daño a nivel cardíaco, hepático, y en otros órganos. En muchos casos llega a ser letal (Sam et al., 1998).

La toxina tiene características hemolíticas y hemoaglutinantes, así como propiedades neuromusculares. Actúa luego que los sarcopodios invaden el epitelio intestinal, se albergan provisionalmente en el hígado y en el bazo y llegan a la musculatura con el torrente sanguíneo. Tras la muerte de los sarcopodios, la sarcocystina liberada desarrolla su acción tóxica – degenerativa sobre el tejido circundante, que produce la calcificación del parásito y de la estructura que lo rodea (Martínez et al., 1999). Hiepe et al. (1981), afirman que la potencia de esta sustancia tóxica varía entre diferentes especies del parásito, o que algunas especies de hospederos son resistentes al efecto tóxico.

#### **2.2.5.- Patogénesis:**

En el hospedero intermediario: Se demostró por primera vez el ciclo de vida y la patogenicidad de *Sarcocystis* en terneros infectados con ooquistes de *Sarcocystis cruzi*. Los signos clínicos fueron anorexia, pirexia, y caquexia; los terneros murieron luego de 33 días. A la necropsia se halló petequias en membranas serosas, fueron hallados esquizontes en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Fayer, 1970). Se encontraron similares signos clínicos y hallazgos de necropsia en vacas (Dubey, 1976).

Muchas de las especies patógenas de *Sarcocystis* causan enfermedad aguda sólo en su hospedador intermediario y no en el hospedador definitivo. En los hospedadores intermediarios, la enfermedad aguda es causada principalmente en las fases iniciales de la merogonia, la cual es llevada a cabo en las células endoteliales de casi todos los órganos internos y la enfermedad crónica es causada en la última fase de la infección. Sin embargo, no hay signos clínicos específicos para la sarcocystiosis (Dubey, 1986; Tender, 1995). La severidad de los signos clínicos depende de la dosis de esporoquistes ingeridos y del estado inmune del hospedador. Se sabe además que el daño tisular durante el estadio quístico está relacionado al tamaño del quiste. Los quistes jóvenes que contienen pocos bradizoitos están rodeados por miofibrillas aparentemente normales, al aumentar el tamaño ocurre la separación de las miofibrillas (Pacheco, 1978).

En un estudio en donde se realizó la infección experimental de alpacas con *Sarcocystis aucheniae*, se halló disminución del hematocrito, incremento de glucosa, dehidrogenasa láctica y uremia, y disminución de la proteína sérica (Sam, 1988). Además en los Estados Unidos se reportó un caso clínico en una alpaca hembra importada de 6 años de edad, que abortó dos horas antes de su muerte un feto de 8 meses de gestación; a la necropsia no se encontraron lesiones en el útero, placenta o feto. Los hallazgos macroscópicos revelaron además hemorragia en la cavidad abdominal, a la microscopía

observaron miositis eosinofílica diseminada asociada a macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*, hemorragia en miofibrillas y necrosis de estas (La Perle, 1999).

Un estudio experimental utilizando proteínas de bradizoitos de macroquistes sonicados (5mg /ml) de *S. aucheniae*, demostró su acción letal en conejos (Sam, 1988). Años posteriores a este estudio se realizó uno complementario con lisado de macroquistes de *S. aucheniae* que fue inoculado a un grupo de 12 conejos, 44 ratones y 2 cobayos con el objetivo de evaluar su actividad biológica. En donde el lisado consistió en 15 péptidos con actividad electroforética entre 25 a 127 kDa. Las manifestaciones clínicas y la acción letal en conejos fue dependiente a la dosis que fue administrada de 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ug de proteína por gramo de peso vivo. Los signos clínicos que presentaron consistieron en postración, disnea, pupila contraída, hipertermia y diarrea. Al examen histopatológico observaron alteraciones en diferentes órganos, siendo el pulmón el más afectado, mostrando severa hiperemia y neumonitis. En los riñones, observaron congestión glomerular y trastornos degenerativos del epitelio tubular. En el hígado se observó congestión de vasos portales y sinusoides hepáticos; así como, degeneración e hiperplasia de hepatocitos. El miocardio presentó alteraciones hemodinámicas similares a las descritas anteriormente. Todos los conejos murieron entre las 5 y 23 horas post inoculación. Los cobayos y ratones inoculados no mostraron signos clínicos hasta los 2 y 8 días post inoculación, respectivamente. Los resultados evidenciaron la presencia de péptidos en el lisado de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* de acción tóxica letal para conejos, dependiente de la dosis administrada y de la resistencia al efecto tóxico en ratones y cobayos (Sam, 1998).

La enfermedad bajo condiciones de campo, tiene generalmente un curso subclínico, sin embargo es posible la presentación de cuadros clínicos agudos y subagudos, debido a la alta contaminación del medio ambiente. (Leguía, 1999). Además, se reconoce que, los sarcoquistes se encuentran adaptados en músculo y sistema nervioso central, sin aparente reacción del animal infectado. Se presume la ruptura de algunos sarcoquistes en algún momento de la infección con probable liberación de productos tóxicos, no existiendo información clara del rol que juega en los procesos de sarcocystiosis crónica (Tadros y Laarman, 1982)

En el hospedero definitivo: el consumo de microquistes (*S. lamarcanis*) provoca cuadros altamente patógenos en perros presentando anorexia, pirexia, diarrea mucosanguinolenta y muerte posterior a los 2 días. En contraste con los perros inoculados con macroquistes (*S. aucheniae*) los que únicamente presentaron diarreas mucosas (Leguía, 1989).

### 2.2.6.- Inmunología

Los componentes antigénicos de *Sarcocystis aucheniae* fueron caracterizados parcialmente mediante separación electroforética en gel SDS poliacrilamida al 10%, que reveló la existencia de 9 péptidos en el rango entre 13 kDa a 124 kDa de peso molecular para el lisado de macroquistes y 7 péptidos entre 12 kDa a 130 kDa para el lisado de microquistes. Estas proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa reaccionaron frente a los sueros anti *Sarcocystis*. Por otro lado, con el análisis inmunológico de estos antígenos mediante la prueba de inmunodifusión doble en gel de agar contra sueros inmunizados de conejo, mostraron tres bandas de precipitación de lisado de macroquiste y dos para el microquiste, siendo una de ellas común para los dos extractos (Sam, 1988). Sin embargo, en otro estudio se encontró 7 bandas proteicas de importancia localizadas entre 190 a 33.5 kDa de peso molecular, que fueron obtenidas de macroquistes de alpacas de Cajamarca (Cabrera, 1996).

Respuesta humoral: La respuesta humoral en los animales domésticos ha sido estudiado en animales inoculados con *Sarcocystis*. Así por ejemplo, bovinos inoculados con *Sarcocystis cruzi* desarrollaron IgM anti *Sarcocystis* a la tercera y cuarta semana post inoculación (p.i.) y retoma a niveles de preinfección a los 2 a 3 meses; y la respuesta de IgG1 se incrementó a la quinta y sexta semanas p.i., permaneciendo altas por más de 5 a 6 meses. En los ovinos (inoculados con *Sarcocystis ovis*) los anticuerpos IgG1 tuvieron un curso similar a lo observado en los bovinos, excepto que los incrementos se presentaron ligeramente más tarde (entre la sexta y octava semana p.i.). No se observó respuesta de IgM cuantificable en ovinos. Anticuerpos IgA e IgG2 anti *Sarcocystis* no fueron detectados en bovinos ni en ovinos (Gasbarre, 1984).

De acuerdo a los resultados de las investigaciones, la primera exposición y la persistencia de anticuerpos a *Sarcocystis* varía con la especie del hospedero, especie de parásito, fuente de antígeno, y la prueba serológica empleada para medir la respuesta humoral (Dubey, 1986).

Respuesta celular: Como podría suponerse de un parásito intracelular, la inmunidad celular es movilizada durante la infección por *Sarcocystis*. Se ha observado infiltración celular en los tejidos viscerales y musculares afectados, siendo esta infiltración en su mayoría macrófagos y linfocitos. Esta infiltración puede permanecer por largo tiempo (Dubey, 1986; Sam, 1988; Leguía, 1990).

No solo en los tejidos viscerales afectados se ha demostrado una respuesta celular. Se han demostrado linfocitos específicos a *Sarcocystis* en la circulación periférica de los bovinos dentro de los 15 días p.i., pero su actividad decrece rápidamente. Por otro lado, en los ovinos la actividad de los



linfocitos no fue evidente hasta la tercera y cuarta semana luego de la inoculación, pero su actividad permaneció por más de cinco y seis meses. Esta respuesta coincide con la liberación de la primera generación de merozoitos en bovinos y ovinos (Gasbarre, 1984).

La intensidad de la respuesta celular vista en animales que sobrevivieron a desafíos letales indica inmunidad mediada por células contra *Sarcocystis*. Los anticuerpos citotóxicos o metabolitos son conocidos como destructores de merozoitos extracelulares en la segunda generación (Dubey, 1986). Además, se conoce que existe una respuesta inmunológica al parásito que involucra la vía de interacciones de la citoquina con el sistema endocrino que son moduladores del crecimiento (Fayer, R. y Elsasser, 1991).

#### **2.2.7.- Diagnostico**

**2.2.7.1.-** Hospedero definitivo: (Perros y zorros) mediante examen de heces a aquellos cánidos que consumieron carne contaminada con macroquistes, que permite la detección de ooquistes y esporoquistes del parásito (Leguía, 1989)

**2.2.7.2.-** Hospedero intermediario: En el caso de diagnóstico de animales que cursan sarcocystiosis aguda es difícil de realizar debido a que hay muchas enfermedades que presentan signos clínicos que llevan a la pérdida de la condición general, además, encontrar parásitos en los tejidos de los animales agudamente infectados no es práctico. Se considera que todos los rumiantes tienen algún sarcoquiste en su musculatura (Dubey, 1986). El diagnóstico presuntivo de la Sarcocistiosis aguda se basa en la eliminación de otros posibles agentes causales, evaluación epidemiológica del hato y su relación con otros animales (especialmente perros) así como, en los hallazgos clínicos (Dubey, 1986).

En cuanto a las técnicas serológicas que se han desarrollado, existen diversas pruebas para la detección de anticuerpos contra *Sarcocystis*. En el Perú, se desarrolló una prueba de ELISA con alta sensibilidad para la detección de anticuerpos contra *Sarcocystis aucheniae* de alpaca. La prueba se estandarizó con antígeno de *Sarcocystis aucheniae* y suero de conejos anti macroquiste de *Sarcocystis aucheniae* (Sam, 1988; Ramírez, 1995). Con la finalidad de mejorar la especificidad en la detección de anticuerpos de alpacas con la técnica de ELISA se estandarizó un método utilizando la Proteína A conjugada con peroxidasa, esta prueba fue capaz de detectar anticuerpos en pequeñas cantidades y con buena especificidad (López, 1992).

La prueba EITB se utilizó para la detección de IgG anti *Sarcocystis aucheniae* en conejos. Se encontraron tres péptidos con movilidad relativa entre 58 a 50 kDa que fueron reconocidos por la IgG de conejos hiperinmunizados (Sam, 1998). Posteriormente se desarrolló y estandarizó una prueba EITB para la detección de anticuerpos anti *Sarcocystis*. Se utilizaron sueros hiperinmunes de conejo anti *S. aucheniae* y suero de alpacas infectadas naturalmente confirmadas mediante necropsia y procedentes de zonas libres de sarcocystiosis. Estas tuvieron una reacción fuerte con bandas comprendidas entre 58 a 50 kDa, mientras que los sueros negativos y los sueros de animales neonatos no mostraron ninguna reacción (Sam, 1998).

**2.2.7.3.- Post mortem:** En el hospedero definitivo, se puede observar la presencia de ooquistes en el tejido intestinal con microscopio óptico (Sam, 1998). En el hospedero intermediario, mediante observación de lesiones anatomopatológicas y presencia de quistes micro o macroscópicos en la musculatura lisa, estriada o cardíaca. En caso de la sarcocystiosis por *S. aucheniae* se realiza mediante la observación de macroquistes en musculatura estriada, lo que implicaría abrir los animales una vez sacrificados (Sam, 1998).

#### **2.2.8.- Tratamiento**

Es poco práctico, ya que no existe terapia efectiva contra infecciones agudas o crónicas. Así la administración experimental de anticoccidiales (amprolium, salinomicina, monensina, halofuginona, etc.) en vacunos y ovinos infectados con dosis letales de esporoquistes evitó la muerte y redujo la severidad de los síntomas clínicos. Sin embargo, la droga tuvo que ser administrada diariamente, durante un mes (Leguía, 1989)

#### **2.2.9.- Prevención y Control**

No existe una vacuna para proteger al ganado vacuno contra la sarcocistiosis clínica, aunque las investigaciones indican que los bovinos, ovinos, caprinos y cerdos pueden ser inmunizados con bajas dosis de esporoquistes (Dubey, 1986). Por lo tanto, la prevención es el único método disponible y práctica de control.

Los carnívoros (perros) deberían ser excluidos de los hábitats, alimentos, agua y dormitorio de las alpacas. La cocción (80 °C), congelación (-10°C por 10 días) y el deshidratado (charqui de carcasas infectadas), constituyen medios eficaces para la inactivación de *Sarcocystis*, pudiendo ser utilizados dichos procedimientos en el tratamiento de carcasas infectadas para evitar su decomiso (Leguía, 1990).

Por otro lado, la carne contaminada con quistes de *Sarcocystis* puede ser expuesta a la acción de saturación con sal común y a la irradiación solar por un período de 5 días, observándose luego de este tiempo macro y microscópicamente la destrucción completa de los quistes, considerando esta técnica como una alternativa al procesamiento de carnes infectadas (Ayala, 1999). Además, un estudio de detoxificación de carne de llama, demostró los efectos físicos de la cocción (100 °C por 10 min), horneado (105 °C por 65 min), y congelado (-20 °C por 10 días), evaluando la sintomatología tóxica en conejos e irrupción del ciclo biológico del parásito en perros, concluyéndose que la cocción, horneado y congelado logran desnaturalizar y detoxificar la sarcocystina de los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*; además afectan la viabilidad de los quistes (Godoy, 2007).

#### **2.2.10.- Epidemiología e impacto en la producción nacional**

La infección por *Sarcocystis* es común en muchas especies de animales alrededor del mundo (Dubey, 1986). Aparentemente todos los camélidos sudamericanos mayores de 2 años están infectados con el ciclo asexual del *Sarcocystis*, tanto en alpacas (Guerrero, 1967) como en llamas (Castro, 1974) en el altiplano del sur del Perú. Así por ejemplo, se realizó un estudio en 200 alpacas sacrificadas para el consumo, con edades que fluctuaban entre los 2 y 15 años, hallándose quistes al examen macroscópico en el 16.5 % de las muestras de esófago, 26.5 % en la pierna y 27.5 % en el cuello. Mientras que, quistes visibles al microscopio se hallaron en el 100 % de las muestras de corazón, 99.5 % en las muestras de esófago, 95.5 % en las muestras de pierna y 87.5 % en las muestras de cuello (Guerrero, 1967).

Se evaluó la importancia económica de las parasitosis en alpacas en los años 1973 y 1974, como causa de decomisos en el camal de Santa Rosa (Melgar, Puno). De 5873 alpacas observadas, se decomisaron 529 carcasas por la presencia de *Sarcocystis aucheniae*, siendo esta la segunda causa de decomiso (Alva, 1980). En otro estudio, se halló que el 3 % de los decomisos de carcasas (seriamente afectadas) eran por la presencia de *Sarcocystis aucheniae* en llamas, beneficiadas en un camal regional del altiplano chileno entre 1985 y 1986 (Rojas, 1993). Se sabe que existe una alta prevalencia (70 % al 100%) de micro y macroquistes hallados en la musculatura de alpacas, llamas, guanacos y vicuñas, estos revelan los altos niveles de contaminación de los pastizales con esta coccidia (Leguía, 1989).

En Bolivia se realizó un estudio sobre la ocurrencia de *Sarcocystis aucheniae* mediante la inspección macroscópica de las canales que se comercializan en los diferentes centros de expendio de

carne de los camélidos. Se inspeccionaron 1023 canales de camélidos, encontrando una media de 24.64 % de canales infectadas con quistes macroscópicos. Las zonas de mayor porcentaje de positivos (31 %) fueron la región de la Cordillera de tres Cruces (Tablachaca), Carangas 30.4 %, Altiplano Norte (El Alto) 28 %, Challapata 28 %, Lahuachaca 25.5 % (Ayala, 1999).

Son varias las condiciones que permiten una prevalencia alta de la infección. Entre ellas la gran eliminación de esporoquistes en las heces de los hospederos definitivos durante largos periodos de tiempo (Leguía, 1989) y la viabilidad de los esporoquistes durante muchos meses en los pastizales debido a su resistencia a las temperaturas extremas (Savini, 1996). Además, los esporoquistes podrían ser esparcidos o protegidos por invertebrados (Dubey et al., 1986). A diferencia de otras especies de coccidia, *Sarcocystis* sale de las heces en su forma infectiva y no depende de condiciones climáticas para su maduración e infectividad. Al parecer los perros desarrollan poca o ninguna inmunidad protectora, pudiendo reinfectarse y eliminar constantemente los esporoquistes (Dubey, 1986; Rojas, 1990).

En camélidos sudamericanos se especula la posibilidad que la crianza conjunta de alpacas y llamas con perros sería determinante en alta prevalencia de la infección. Pero, es muy probable también la participación importante de los cánidos silvestres en la transmisión y en la prevalencia (Leguía, 1989). Las características socioculturales y la cosmovisión del criador permiten el consumo de carne cruda de alpaca infectada por los perros. Asimismo, la matanza clandestina o domiciliaria y en camales de centros urbanos que no permiten mínimas condiciones higiénicas y sanitarias, contribuyen a que los cánidos tengan acceso a las carnes. Pese a que los animales adquieren inmunidad después de la exposición a pequeñas dosis infectivas, lo cual previenen cuadros clínicos, esto no evita su cronicidad, que se traduce en la presencia masiva de micro y macroquistes en animales adultos, es probable que las mismas especies de *Sarcocystis* infecten a todos los camélidos sudamericanos (Leguía, 1989).

La sarcocystiosis crónica puede ser el resultado de la ingestión de una baja dosis de esporoquistes de un *Sarcocystis* patógeno y puede causar pérdidas económicas en la industria ganadera debido a la reducción de la calidad y cantidad de carne, lana o fibra en vacunos, cerdos, ovejas y camélidos (Dubey, 1986; Leguía, 1990). Estas infecciones han sido estimadas a razón de varios millones de dólares en pérdidas anuales, debido a los decomisos de carnes conteniendo sarcoquistes groseramente visibles en el ganado vacuno de los Estados Unidos (Dubey, 1986) y por pérdidas anuales de cerca del 20 % atribuibles directamente a los parásitos en las alpacas (Leguía, 1991). Las pérdidas económicas producidas por la infección clínica y subclínica son difíciles de calcular, porque casi el 100% de los

vacunos, ovinos y camélidos se encuentran infectados, por lo que es difícil diferenciar entre animales afectados y no afectados.

#### **2.2.11.- En salud pública**

Esta enfermedad se le conoce vulgarmente como "triquina" o "arrocillo" y constituye una zoonosis tóxica por la acción contenida en los quistes. En el caso de la sarcocystiosis producida por *Sarcocystis aucheniae*, el consumo de carne infectada con macroquistes cobra importancia por ocasionar trastornos digestivos, dolor abdominal, diarrea, escalofríos, náuseas y vómitos (Leguía, 1989), comprobándose que el consumo de carne infectada cruda o insuficientemente cocida produce estos trastornos; y que es atribuido por los campesinos a la "frescura de la carne" (Leguía, 1991).

Un estudio indujo un cuadro clínico de gastroenteritis en monos alimentados con carne de alpaca infectada con micro o macroquistes, cruda o insuficientemente cocida, caracterizado por diarrea, cólicos abdominales y escalofríos entre las 3 a 8 horas después de la ingestión y durante 3 días seguidos luego de los cuales los animales se recuperaron sin ningún tratamiento (Leguía, 1990).

En humanos la sarcocystiosis puede presentar 2 síndromes: el primero por las toxinas presentes en los quistes y el otro como consecuencia de la fase intestinal de los sarcocistos. El primero aparece de 3 a 8 horas después de ingerir carne infectada y se prolonga de 24 a 36 horas, presentando anorexia, náuseas, dolores intestinales sin fiebre. Esta intoxicación puede confundirse con una intoxicación o toxi-infección alimentaria. El segundo de los síndromes citados presenta un periodo de incubación de 10 a 15 días y se manifiesta por diarrea, que se prolonga durante 8 a 10 días. Estos casos se dan cuando el hombre es el hospedero definitivo (García, 2003).

Al provocar una respuesta inflamatoria tanto aguda como crónica en camélidos sudamericanos, es indispensable conocer cómo responde el organismo frente a esta infección. Por tanto se requiere el estudio de las citoquinas proinflamatorias probablemente involucradas en esta enfermedad, estas se detallan a continuación.

### **2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa transcriptasa reversa en tiempo real (RT-PCR)**

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARN mensajero (mRNA) de una muestra. Utilizando primers específicos

de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN.

### **2.3.1. Componentes de PCR:**

**Muestra (DNA):** El tipo de muestra puede ser DNA de diversas fuentes: animal, vegetal, bacterial o viral. Moléculas de RNA pueden servir como moldes para amplificación después de su conversión en moléculas de DNA complementarios (cDNA) a través de un paso de transcripción reversa.

**Cebadores (“Primer”):** También llamados iniciadores tienen una longitud entre 20 a 24 nucleótidos, y aproximadamente 50 a 60% de contenido G+C. Se debe tener en cuenta que los primers no deben ser complementarios entre sí para evitar la formación de dímeros de primers (Valasek y Repa, 2005).

**Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>):** El cloruro de magnesio es un cofactor esencial de la DNA polimerasa usada en PCR y su concentración debe ser optimizada. La presencia de agentes quelantes en la reacción afectan la concentración de iones Mg<sup>2+</sup>. Es por eso que la concentración total de magnesio debe exceder la de los dNTPs en la reacción (Valasek y Repa, 2005).

**Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs):** Los cuatro dNTPs (dUTP, dGTP, dATP, dCTP), son los que forman las nuevas cadenas de DNA, y deben encontrarse en la misma concentración (Rodríguez y Barreda, 2004).

**Enzima:** La enzima que cataliza la reacción de PCR es una ADN polimerasa dependiente de ADN. La más comúnmente usada es la polimerasa del *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Animales

Se utilizaron 5 animales: 3 alpacas hembras y 2 alpacas machos adultos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos del Laboratorio de Reproducción Animal. Para la obtención de sangre entera se empleó la vía venopunción en vacutainers de 7ml de capacidad conteniendo EDTA.

Los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*, se recolectaron de 5 alpacas infectadas naturalmente y sacrificadas en el camal municipal del departamento de Huancavelica, provincia de Huancavelica.

#### 3.2.- Obtención de muestras

##### 3.2.1.- Obtención del extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*

###### 3.2.1.1.- Obtención de macroquistes:

Los macroquistes fueron extraídos de los cuellos de los animales infectados naturalmente, utilizando pinzas y tijera estériles, libres de fibras musculares y conservando sus respectivas envolturas quísticas, y colocados en PBS evitando así que los macroquistes se deshidraten.

###### 3.2.1.2.- Preparación del extracto de macroquistes:

Los macroquistes obtenidos fueron molidos en un mortero frío con PBS (5ml) hasta obtener una pasta homogénea. Luego se centrifugó por 10 minutos a 3000 RPM a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en Medio Mínimo Esencial (MEM) en la proporción de 1 en 2.

Esta suspensión fue sometida a ultrasonido (sonicado), para la ruptura de membranas celulares, de manera que se expuso el pellet de macroquistes con MEM a ultrasonificación (Fisher-300) durante 60 ciclos/s en intervalos de 60 segundos cada uno. Se observó, vía microscopio, la destrucción de membranas celulares. Los productos sonicados fueron centrifugados a 1200 RPM durante 20 minutos, siguiendo el protocolo descrito por Sam (1998). Se colectó el sobrenadante y el pellet de forma separada, guardándose en congelación a -20 °C para su preservación.

La concentración de proteínas totales (antígenos totales) del extracto obtenido del pellet fue medido mediante el kit Qubit Starter (Invitrogen, USA) empleando el reactivo designado para proteínas y

siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de antígeno total fue ajustada para los distintos tratamientos mediante dilución en MEM libre de antibióticos.

### **3.2.2.- Obtención de leucocitos**

La sangre fresca de alpacas se centrifugó inmediatamente después de ser colectada, a 3500 RPM durante 5 minutos, esto permitió la separación en tres componentes visibles: plasma, capa flogística (leucocitos) y el cúmulo eritrocitario. Se colectó la capa flogística producto de la centrifugación en crioviales de 2ml de capacidad, los que fueron sometidos al tratamiento de lisis de glóbulos rojos mediante cloruro de amonio.

La capa flogística fue purificada para eliminar glóbulos rojos de su contenido mediante lavado de los leucocitos agregando PBS 0.15M a pH 7.2 y centrifugación a 2500 RPM durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 5 volúmenes de Tris 0.01M - cloruro de amonio 0.85% frío, homogenizando e incubando en refrigeración a 4 °C, durante 1 hora. Una vez concluido el tiempo de incubación, se centrifugó a 1000 RPM durante 10 minutos, tras los cuales se eliminó el sobrenadante. Los leucocitos se lavaron 3 veces con PBS de manera similar a lo ya descrito para eliminar restos de cloruro de amonio. Los leucocitos lavados se resuspendieron en MEM libre de antibióticos.

### **3.3.- Procedimiento:**

#### **3.3.1.- Enfrentamiento y cultivo de leucocitos**

Para determinar la calidad y viabilidad de los leucocitos purificados, se empleó el colorante vital azul de tripán al 0.3% en proporción 1:2 con los leucocitos resuspendidos en MEM; se contaron las células vivas a través de la cámara de Newbauer en microscopio óptico 40x. Se empleó la fórmula siguiente para calcular el número de células vivas totales de la suspensión (Darling, 1993):

$$\text{Número de leucocitos/ml} = \text{Promedio de la sumatoria de los 4 cuadrantes} \times 2 \times 10000.$$

Obtenido el promedio total de células viables, éstas fueron diluidas para obtener suspensiones de 500,000 leucocitos vivos/ml.



Cada tratamiento experimental consistió del enfrentamiento 500,000 leucocitos vivos de alpaca adulta enfrentados a concentraciones crecientes de antígeno total de macroquistes de *S. aucheniae* (0.5ng/ml, 1ng/ml, 50ng/ml, 500ng/ml y 1ug/ml) por periodos de 1 hora, 12 horas y 24 horas en todas las dosis. Adicionalmente, y por cada tratamiento, se adicionó un control de leucocitos (500,000/ml) inoculados con suero fisiológico para evaluar las variaciones normales en la expresión de las Interleuquinas debido al procedimiento experimental.

Los enfrentamientos se realizaron en placas de cultivo descartables y bajo incubación a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Al final de cada tratamiento, los leucocitos de todos los tratamientos fueron recuperados en crioviales de 1.5 ml y centrifugados a 2500 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante fue retirado, mientras que las células fueron congeladas a -35 °C hasta su uso en la extracción de ARN total.

### **3.3.2.- Obtención de ARN**

Para evaluar la expresión de las Interleuquinas IL 1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 6 y TNF $\alpha$ , las muestras se procesaron con TRIZOL®Reagent (Invitrogen, USA), para la obtención de los ARN totales, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se adicionó 1ml de trizol a cada muestra y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 200  $\mu$ l de cloroformo, homogenizando durante 15 segundos. Se centrifugó a 14000 RPM durante 15 minutos a 8 °C, recuperándose luego 500ul de la fase acuosa conteniendo el ARN total, el que fue precipitado con 500ul de alcohol isopropílico a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó a 14000 RPM durante 10 minutos a 8 °C y se eliminó el sobrenadante.

Se agregó 1 ml de etanol al 75%, homogenizando la muestra con vórtex y se centrifugó a 7500 RPM durante 5 minutos a 8 °C. El ARN obtenido se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Se almacenó en congelación a -70°C, hasta su procesamiento para RT – PCR.

### 3.3.3.- Síntesis de cADN

Para la transcripción reversa (RT) se utilizó el kit SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green Two-Step qRT-PCR Kit with ROX (Invitrogen, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se preparó una solución Master mix, conteniendo todos los componentes del Kit que intervienen en la reacción, como sigue:

2x RT Reaction mix	10 µl x n*
RT enzyme mix	2 µl x n
Agua libre de nucleasas	6 µl x n
ARN total 2ul	2 µl x n

**\*n: es el número de muestras a trabajar.**

Se colocó 18 µl del master mix en tubos para termociclador en tiempo real y se adicionaron 2 µl de muestra (ARN total), para obtener un volumen de reacción de 20 µl. Las muestras fueron llevadas al termociclador PTC 200 (Peltier therme cyler) Chromo 4 (detector continuo de fluorescencia) de MJ Research, incubándose a 25°C por 10 minutos, 37 °C por 20 minutos y 85°C por 5 minutos para terminar la reacción. El producto obtenido fue congelado a -70°C hasta su uso en el PCR.

### 3.4.- PCR tiempo real:

El PCR en tiempo real fue realizado en un termociclador equipado con un monitor de detección de fluorescencia continua de la marca MJ Research – BioRad, usando el agente intercalante Sybr Green, que se intercala entre el ADN de doble hebra, permitiendo de esta forma, la evaluación de la amplificación “ciclo por ciclo”. Para esto se utilizó el ADN complementario (ADNc) de los ARN totales obtenidos en el paso anterior (Transcripción reversa). Se emplearon los oligonucleótidos específicos descritos por Odbileg y col (2005) (Tabla 2).

**Tabla N° 2:** Oligonucleótidos y temperatura de hibridación para RT-PCR tiempo real para detección de las Interleuquinas 1, 6 y TNF- $\alpha$ .

Citoquina	Tamaño (pb)*	Oligonucleótidos	Ta** (°C)	Acceso Gene Bank
IL 1 $\alpha$ F (5')	172	GATGCCTGAGACACCCAA	53	AB107645
IL 1 $\alpha$ R (3')		GAAAGTCAGTGATCGAGGG		
IL 1 $\beta$ F(5')	259	AAGTGGTGTCTGTCATGAGC	53	AB107644
IL 1 $\beta$ R(3')		TGACAAGTGCTGATGTACCA		
IL 6 F(5')	193	CTCTGCAATGAGAAAGGAGA	51	AB107647
IL 6 R(3')		GGTAGTCCAGGTATATCTGA		
TNF $\alpha$ F(5')	251	CTACTCCCAGGTCCTCCTGA	56	AB107646
TNF $\alpha$ R(3')		GGTAGTTGGGCATGTTGATC		
GAPDH F (5')	356	GTGAAGGTCGGAGTGAACG	60	Patil <i>et al.</i>
GAPDH R (3')		GAGATGATGACCCTCTTGGC		

\*pb: Tamaño del producto en pares base.

\*\*Ta: Temperatura de annealing o hibridación

Para la reacción en tiempo real se empleó el kit SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green Two-Step qRT-PCR Kit with ROX (Invitrogen, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se preparó un master mix conteniendo todos los componentes de la reacción, a excepción del ADNc, como se detalla a continuación:

Sybr green super mix	10 $\mu$ l x n*
Primer Forward (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l x n
Primer Reverse (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l x n
ROX diluido (1:10)	1 $\mu$ l x n
Agua libre de nucleasas	6.2 $\mu$ l x n

\*n= Número de muestras a analizar

Se procedió a dar ligera agitación de 2 – 3 segundos para homogenizar la mezcla. Se colocó 18 µl del “master mix” en viales para PCR tiempo real y se adicionaron 2 µl de ADNc templado. Se llevó al termociclador PTC 200 (Peltier therme cyler) Chromo 4 (detector continuo de fluorescencia) de MJ Research, empleándose protocolos de acuerdo a la temperatura de disociación de cada juego de oligonucleótidos (tabla 2) determinados por Odbileg et al (2005).

Como control endógeno se evaluó la producción del ARNm del gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa), necesario para la técnica cuantitativa y la evaluación de la técnica molecular. Se empleó el protocolo: 50 °C por 2 minutos (Incubación con UDG), 95 °C por 10 minutos (Inactivación UDG y activación de DNA polimerasa), seguido de 40 ciclos de: 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto.

Para determinar la producción de los ARNm de las citoquinas IL 1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 6 y TNF $\alpha$  se empleó: 50 °C por 2 minutos (Incubación con UDG), 95 °C por 10 minutos (Inactivación UDG y activación de DNA polimerasa), seguido de 40 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, temperatura de hibridación de cada juego de oligonucleótidos en grados Celsius (ver tabla 3) por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos.

Los resultados fueron evaluados a través del software “Opticon Monitor” versión 2.1, obteniéndose los valores de Ct (Cycle threshold o ciclo umbral) para su uso en el análisis  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  como método de cuantificación relativa y el valor de Tm (Temperatura de melting o disociación) de cada uno de los productos para evaluar la especificidad de los productos amplificados. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento y por cada Interleuquina evaluada para obtener los promedios de Ct y Tm de cada uno de los tratamientos.

### **3.5.- Electroforesis de los productos de RT PCR**

Para el análisis de los productos del RT-PCR de Interleuquinas IL 1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 6, TNF $\alpha$ , se empleó la técnica de electroforesis en geles agarosa al 2% en buffer TBE 1x (ANEXO 8). Se tomaron 20 µl de los productos de PCR y se adicionaron 4 µl de buffer de carga 6x (ANEXO 8) a cada una de las muestras, cargándose la mezcla en los carriles del gel. Se utilizó un carril para el marcador de peso molecular Novagen Perfect DNA Ladder (Novagen, USA). La electroforesis se realizó a 100V por 1

hora en una cámara de electroforesis horizontal (Biorad, USA). Al final de la corrida electroforética, las bandas de ADN teñidas con bromuro de etidio fueron visualizadas en un transiluminador UV.

### **3.6.- Cuantificación relativa de los productos de RT-PCR Tiempo Real (citoquinas)**

La cuantificación relativa permite el análisis de resultados de una forma mucho más sencilla usando métodos matemáticos (Pfaffl, 2001) ya que se compara entre diferentes muestras (tejidos, tratamientos, time-points, etc) la cantidad relativa o relación del ARNm de un gen específico respecto a la cantidad del ARNm de un gen constitutivo (control endógeno).

La cuantificación relativa de los resultados de las Interleuquinas IL 1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 6, TNF $\alpha$ , se realizó con el Método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  o Método Ct comparativo (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Applied Biosystems, 2001; Rebrikov y Trofimov, 2006). El método se basa en el análisis comparativo de los Cts de las muestras, comparados con el Ct de un control endógeno (GAPDH) en relación a una muestra calibrador. Como sigue:

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

N = Cantidad relativa de ARNm con respecto al calibrador

$\Delta\Delta Ct$  = Diferencia entre el control endógeno y el ARNm a analizar con respecto al calibrador.

Los resultados son presentados como cantidades en número de veces con respecto a un calibrador. De esta forma, se obtuvo los niveles de expresión de Interleuquinas IL 1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 6, TNF $\alpha$ , con respecto a un calibrador (control de leucocitos inoculados con suero fisiológico). Se empleó un calibrador para cada período de tiempo evaluado, existiendo 3 calibradores que consistieron de leucocitos inoculados con suero fisiológico incubados por una hora, 12 horas y 24 horas. Bajo este esquema, se compararon los niveles de expresión de ARNm de las Interleuquinas bajo distintas concentraciones de dosis de antígeno completo en un mismo período de tiempo (1, 12 y 24 horas).

Igualmente, se compararon los niveles de expresión de ARNm de las Interleuquinas evaluadas bajo la misma concentración de antígeno completo pero en diferentes periodos de tiempo para evaluar el

cambio de expresión a través del tiempo. Para este efecto, se tomó como calibrador al control de leucocitos con suero fisiológico con una hora de incubación como nivel basal de expresión.

### **3.7. Análisis estadístico:**

Se calcularon los valores de promedio  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  por cada tratamiento y tiempo, de este valor se calcularon la varianza, Desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV). Se empleó el software Stata SE 10.1 para realizar la prueba de ANOVA para determinar si existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos por cada periodo y entre los distintos periodos de un mismo tratamiento.

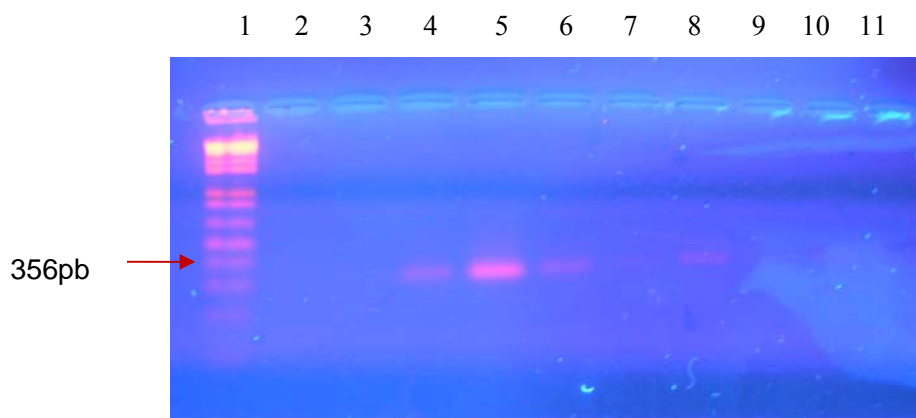
Adicionalmente, se realizó una prueba de correlación para determinar la correlación existente entre la concentración de antígeno completo de *S. aucheniae* y los niveles de expresión de ARNm de las diferentes Interleuquinas evaluadas bajo un mismo periodo.

#### IV. RESULTADOS

##### RT – PCR en Tiempo Real del ARNm de *GAPDH*:

Todos los tratamientos evaluados mostraron la presencia de ARNm de *GAPDH* evidenciado a través de la técnica RT-PCR Tiempo Real y corroborado a través del gel de agarosa al 2% donde se observó un producto único de 356pb correspondiente a lo descrito por Patil et al (2004) (Figura 1). Indicando la viabilidad de los leucocitos (todos o algunos) durante el periodo de los tratamientos.

**Figura 1.** Electroforesis en gel de Agarosa al 2% de los productos del RT-PCR de *GAPDH*. 1: Novagen Perfect DNA 50bp ladder. 2 y 3: Vacío. 4: Suero Fisiológico x 24 horas. 5: 0.5ng x 1 hora. 6: 1ng x 1 hora. 7: 50ng x 1 hora. 8: 500ng x 1 hora. 9: 1µg x 1 hora. 10 y 11: Vacío.

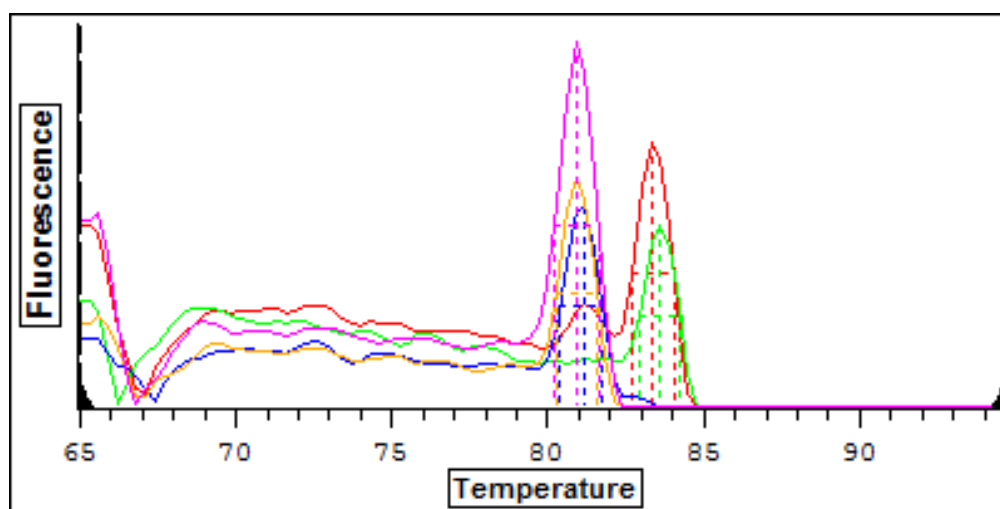


La técnica RT-PCR tiempo real de todos los enfrentamientos antígenicos a la 1, 12 y 24 horas, utilizando el set de oligonucleótidos *GAPDH* mostraron que el 100% de las muestras (18/18) amplificaron un producto único y específico con temperatura de disociación ( $T_m$ ) de  $80.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$  ó  $83.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$  (Figura 2), encontrándose en mayor frecuencia la temperatura de disociación de  $80.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$  en un 72% (13/18) y  $83.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$  en un 28% (5/18) (ANEXO 1), teniendo total correspondencia con los productos de 356pb observados en los geles de agarosa.

El análisis de Ciclo Umbral (Ct) detectó la amplificación logarítmica de los productos observados en el análisis de  $T_m$ . Los valores de Ct variaron en un rango de 32.01 a 37.14 (ANEXO 1), indicando la presencia en diversas concentraciones y amplificación de ADNc inicial en cada una de las muestras

que logró ser detectada a través de la técnica. Los promedios de valores de Ct de cada tratamiento y controles fueron empleados en la técnica de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$  y se encuentran detallados en el ANEXO 1.

**Figura 2.** Análisis de Temperatura de Disociación de los productos de RT-PCR Tiempo Real empleando oligonucleótidos GAPDH. *Fucsia*, *Naranja* y *azul*  $T_m = 80.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$  ; *Rojo*  $T_m = 83.3^\circ\text{C}$  y *Verde*  $T_m = 83.6^\circ\text{C}$ .

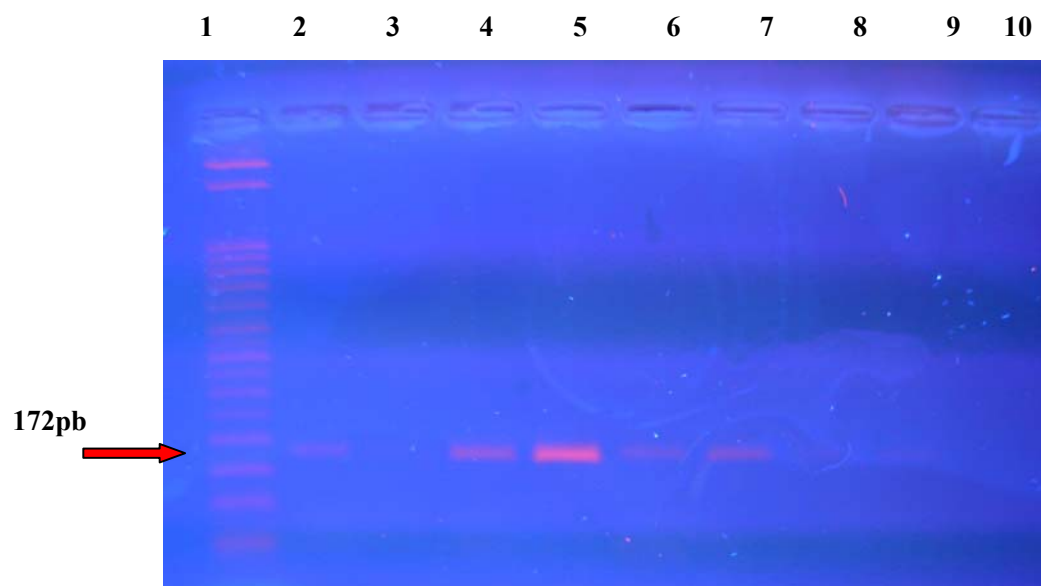


#### RT – PCR en Tiempo Real del ARNm de IL-1 $\alpha$

En la figura 3 se muestran los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos del RT-PCR de todos los tratamientos y controles empleando el set de oligonucleótidos IL-1  $\alpha$ , mostrando que el total de las muestras y controles presentaron una banda de ADN amplificado de 172pb (Novagen Perfect DNA 50bp ladder).

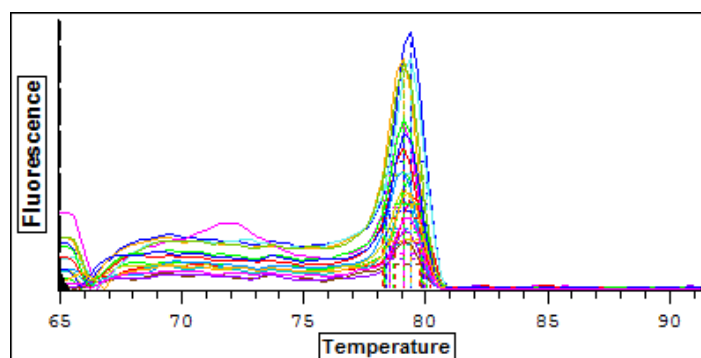


**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa 2% Productos RT-PCR Tiempo Real IL-1 $\alpha$ . 1: Novagen Perfect DNA 50bp ladder. 2: Suero fisiológico x 1 hora. 3: Vacío. 4: Suero Fisiológico x 24 horas. 5: 0.5ng x 1 hora. 6: 1ng x 1 hora. 7: 50ng x 1 hora. 8: 500ng x 1 hora. 9: 1 $\mu$ g x 1 hora. 10: Vacío



A la prueba RT-PCR tiempo real para detectar el ARNm de IL- 1  $\alpha$ , se observó que todas las muestras presentaron curva de amplificación (Ct) clara y exponencial, y una curva de disociación (Tm) única sin ruido de fondo, representando la expresión de IL-1  $\alpha$  y un amplificado específico. El análisis del ciclo umbral (Ct) mostró valores entre 27.86 y 36.00 (ANEXO 2). La curva de disociación mostró un pico único, con leve ruido de fondo y una temperatura entre 79.1 y 79.4 °C, encontrándose que el 61.11% de las muestras (11/18) poseen una Tm de 79.1°C y el 38.89% (7/18) exhiben el producto de 79.4°C (Figura 4).

**Figura 4.** Análisis de Temperatura de Disociación de los productos de RT-PCR Tiempo Real empleando oligonucleótidos IL- 1  $\alpha$ . Todas las muestras estudiadas tienen un Tm= 79.1°C.

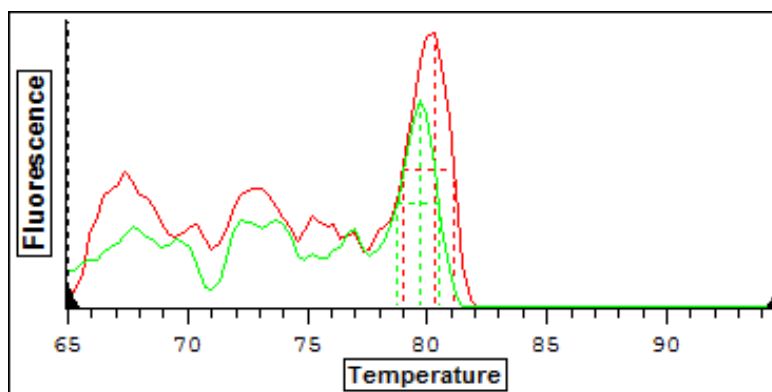


### RT – PCR en Tiempo Real del ARNm de IL-1 $\beta$

El RT PCR para amplificar una región del mRNA de la IL 1 $\beta$ , evidenció un producto de 259pb en la electroforesis en gel de agarosa al 2%, como lo esperado.

En el RT-PCR Tiempo Real, los productos observados mostraron la expresión de un producto específico concordante con lo observado en el gel de agarosa. Se observaron valores de Ct desde 33.57 hasta 37.69. El análisis de la temperatura de disociación ( $T_m$ ) mostró que los productos específicos de IL 1  $\beta$  tienen una temperatura desde 79.4°C hasta 80.9°C, obteniéndose que los productos de  $T_m$  de 79.4°C se observaron en el 25% de las muestras, siendo la  $T_m$  de mayor frecuencia de 79.7°C con 37.5%, el 25% de las muestras tuvo una temperatura de 80.3°C y el 12.5% mostró una  $T_m$  de 80.9°C (Figura 5) (ANEXO 3).

**Figura 5.** Temperatura de disociación de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos IL 1  $\beta$ . Rojo: 50ng/ml x 12 horas ( $T_m$ =80.3°C). Verde: 500ng/ml x 12 horas ( $T_m$ = 79.7°C).

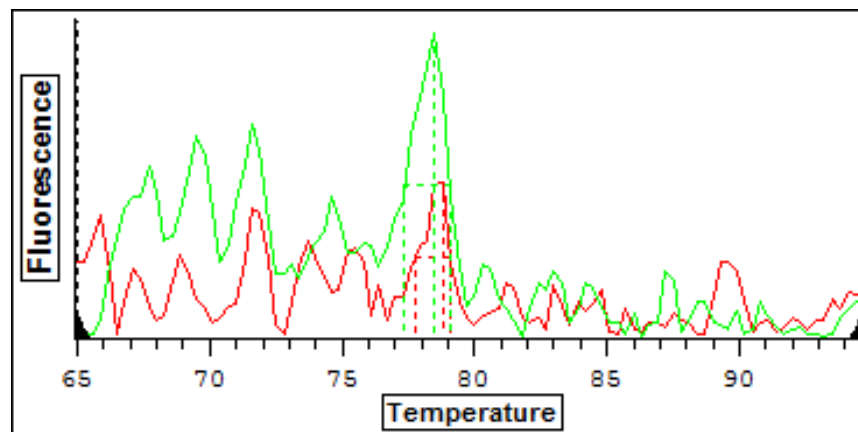


### RT – PCR en Tiempo Real del ARNm de IL 6:

El gel de agarosa al 2% de los productos del RT- PCR empleando los oligonucleótidos para detección de IL-6 fue negativo para todas las muestras analizadas. Por tal motivo, se emplearon adicionalmente controles de ARN total de células entéricas de alpacas jóvenes, tanto sanas como enfermas, amplificando el producto esperado de 193bp como lo reportado por Odbileg y col (2005).

En la prueba en Tiempo Real, no se observó ningún Ct en las muestras, pero sí en los controles de mucosa intestinal de alpaca joven, encontrándose la amplificación de un producto específico entre 78.5°C y 78.8°C correspondiéndose a los productos en agarosa, lo que indica que los oligonucleótidos sí amplifican específicamente el ADNc de IL-6 (Figura 6), aunque las concentraciones de esta Interleuquina no son detectables en las muestras del estudio inoculadas con antígeno total de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*.

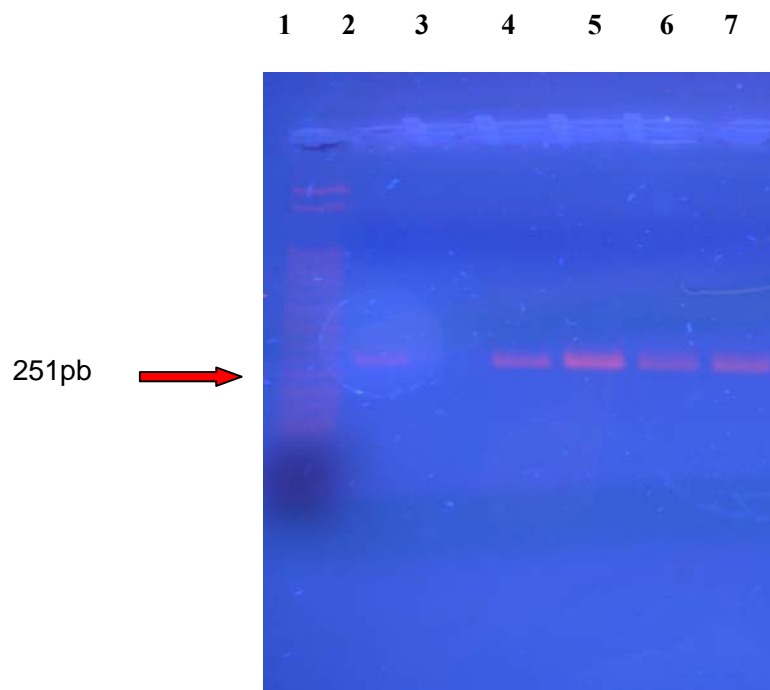
**Figura 6.** Temperatura de disociación de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos IL 6. Rojo: Alpaca enferma (Tm=78.8°C). Verde: Alpaca sana (Tm= 78.5°C).



#### RT – PCR en Tiempo Real del ARNm de TNF $\alpha$ :

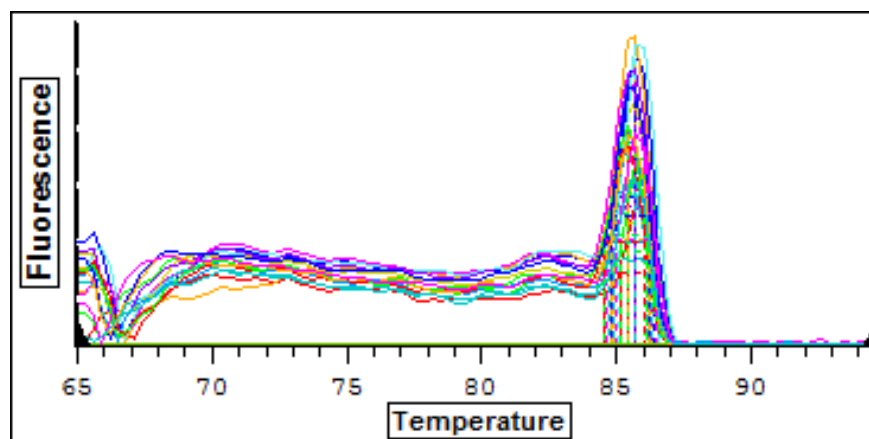
La electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT-PCR empleando los oligonucleótidos para TNF  $\alpha$  demostró que el total de las muestras y controles presentaron una banda única y específica de ADN amplificado de 251pb, tal cual lo descrito por Odbileg y col (2005) (Figura 7).

**Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos RT-PCR Tiempo Real para TNF- $\alpha$ .** 1: Novagen Perfect DNA 50bp ladder. 2: Suero fisiológico x 1 hora. 3: Vacío. 4: Suero Fisiológico x 24 horas. 5: 0.5ng x 1 hora. 6: 1ng x 1 hora. 7: 50ng x 1 hora.



La prueba RT-PCR en Tiempo Real mostró curvas de amplificación con valores de Ct (ciclo umbral) entre 26.01 y 35.19 en todas las muestras evaluadas (ANEXO 8) variando según los distintos tratamientos. El análisis de la curva de disociación ( $T_m$ ) mostró un pico único, con leve ruido de fondo y una temperatura entre 85.1°C hasta 86°C determinado la especificidad del producto (Figura 7). Se observó una frecuencia de 5.88% (1/17) para los productos de 85.1°C, 41.18% (7/17) para los productos de 85.4°C, 41.18% (7/17) para los productos de 85.7°C y 11.76% (2/17) para los productos de 86°C (ANEXO 4, Figura 8).

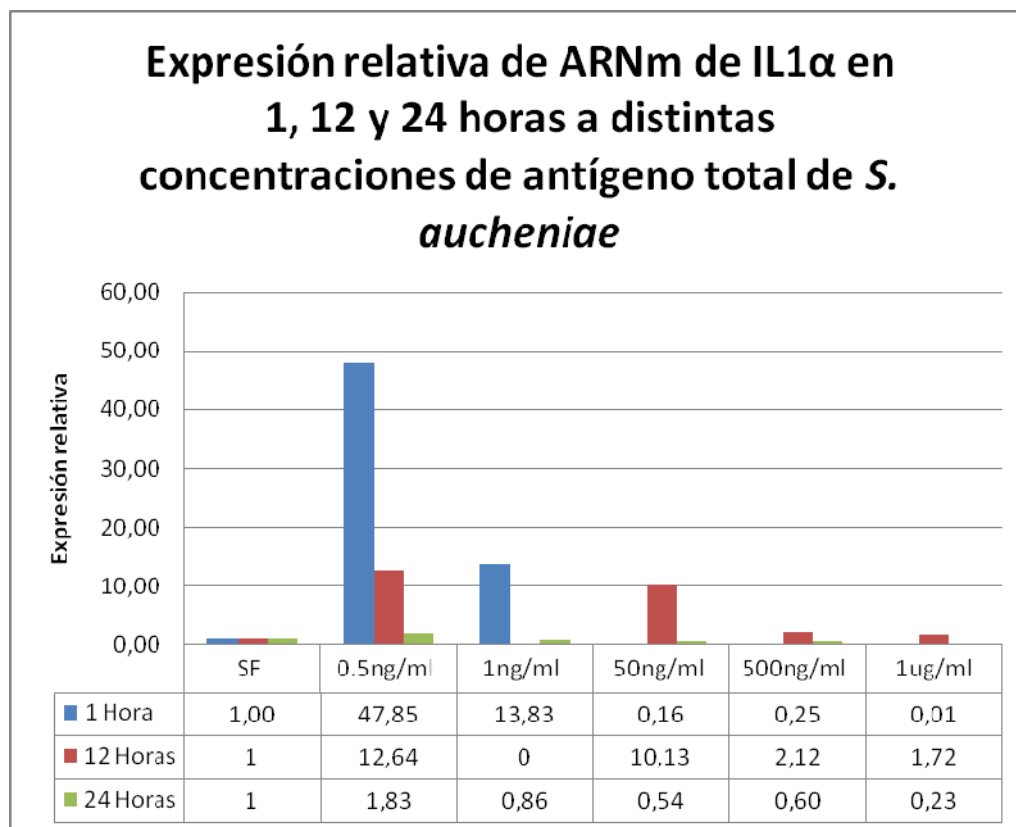
**Figura 8.** Temperatura de disociación de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos TNF  $\alpha$ . Los productos se ubican en un rango cercano entre 85.1 y 86°C.



**Cuantificación relativa de IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  en un mismo periodo a dosis distintas de antígeno completo de *S. aucheniae*:**

Empleando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se encontró que la IL-1 $\alpha$  se expresó en niveles máximos de 47.85 veces lo expresado en el calibrador (leucocitos tratados con suero fisiológico) a dosis mínima de 0.5ng/ml por 1 hora. Se observó que los niveles de expresión IL-1 $\alpha$  descienden hasta niveles relativos inferiores al calibrador (la centésima parte) en este mismo periodo a dosis máxima de 1000ng/ml del extracto. Similarmente, se observó que a partir de las 12 horas de incubación hay un decremento progresivo en la expresión de esta Interleuquina siendo la expresión máxima de 12.64 veces lo expresado por el calibrador a la dosis mínima de antígeno (0.5ng/ml) con un mínimo de expresión de 1.72 veces en la dosis máxima de antígeno. Siguiendo el mismo patrón, a las 24 horas de incubación se observan niveles de expresión hasta de 1.83 veces lo expresado por el calibrador (leucocitos inoculados con suero fisiológico) empleando la dosis mínima de antígeno mientras que la dosis máxima alcanza sólo 0.23 veces lo expresado por el mismo (Gráfico 1, Anexo 5).

**Gráfico 1.** Expresión relativa de ARNm de IL1 $\alpha$  en los periodos de tiempo evaluados a distintas dosis de antígeno total de *S. aucheniae* empleando la técnica  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .



\*p< 0.05

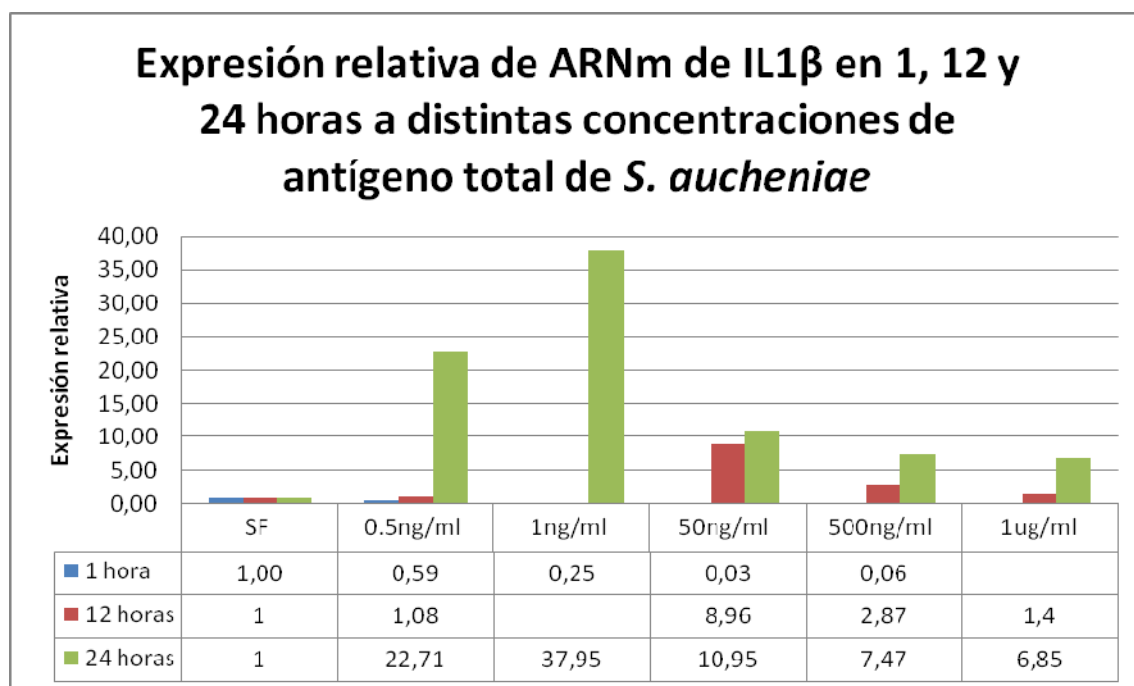
Según la prueba de anova, existe diferencia estadística significativa entre los grupos evaluados según la dosis de antígeno y los distintos periodos de estudio ( $p<0.05$ ). Se hallaron los coeficientes de correlación entre los niveles de expresión de ARNm de IL1 $\alpha$  y la concentración de antígeno total de *S. aucheniae*, encontrándose correlación negativa en todos los casos que fue de -0.40 a la hora de incubación, -0.23 a las 12 horas y -0.65 a las 24 horas, lo que corrobora la observación del patrón descendente en la expresión de ARNm de IL1 $\alpha$  desde 0.5ng/ml hasta los 1000ng/ml, es decir, de menor a mayor concentración de antígeno.

El análisis para expresión de IL-1 $\beta$  exhibe un patrón distinto a lo observado para IL-1 $\alpha$ . Este caso particular señala que los niveles de expresión de ARNm de esta Interleuquina son inferiores al control en todas las concentraciones de antígeno después de una hora de incubación, alcanzando como

máximo expresar 0.59 veces lo expresado por el calibrador de este periodo a dosis mínimas de 0.5ng/ml, tal expresión disminuye conforme la concentración antigénica aumenta hasta alcanzar 0.06 veces lo expresado por el mismo calibrador a dosis máximas de 1µg/ml. A las 12 horas de incubación se observa incremento en la expresión de los mensajeros desde 1.4 veces (dosis máxima de 1µg/ml) hasta 8.96 veces (a dosis de 50ng/ml) lo expresado por el calibrador para ese periodo.

A las 24 de incubación, se observa incremento en la expresión de ARNm de esta Interleuquina de hasta 37.95 veces (a dosis mínimas de 1ng/ml de antígeno) lo expresado por el calibrador para ese periodo, similarmente a lo encontrado en las evaluaciones a la hora y a las 12 horas (Gráfico 2, Anexo 5), a diferencia de IL1α donde los valores máximos de expresión se hallaron a la hora de incubación con las menores dosis de antígeno.

**Gráfico 2.** Expresión relativa de ARNm de IL1β en los periodos de tiempo evaluados a distintas dosis de antígeno total de *S. aucheniae* empleando la técnica  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

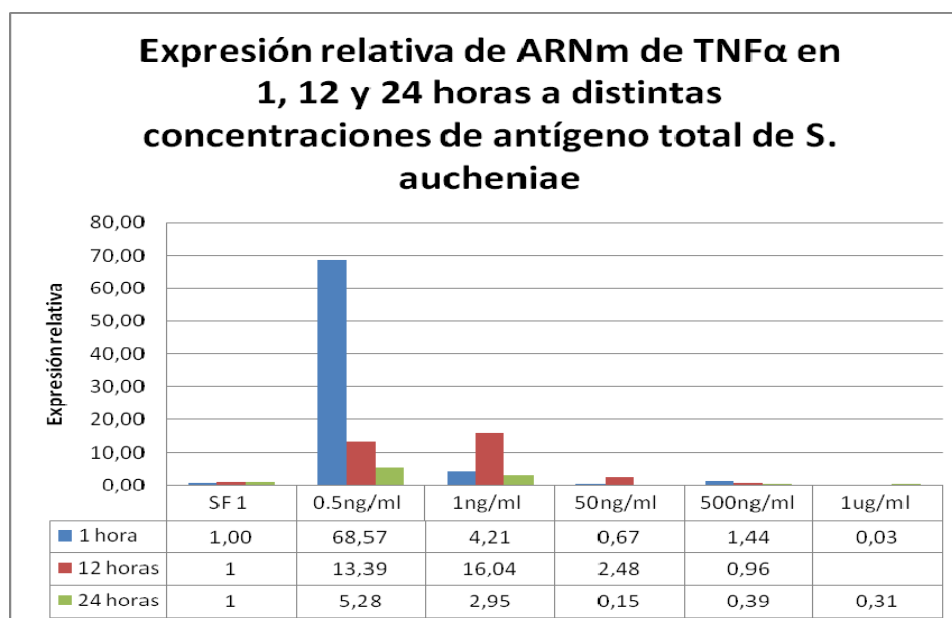


\*p<0.05

La prueba de ANOVA señala que existe diferencia estadística significativa entre los grupos de estudio, de acuerdo a concentración de antígenos y entre los periodos evaluados. Los coeficientes de correlación también fueron negativos en todos los casos, siendo de -0.50 a la hora de tratamiento, -0.25 a las 12 horas y -0.40 a las 24 horas, mostrando una correlación negativa moderada y corroborando la observación de que a mayor concentración antigénica menor es la expresión de ARNm de IL1 $\beta$ .

Finalmente, los resultados para TNF- $\alpha$  indican un patrón de expresión similar a lo observado para IL1 $\alpha$ , encontrándose que los máximos niveles de expresión de esta Interleuquina se ubican en los tratamientos a dosis mínimas y en el período de una hora de incubación. Se encontró que la expresión llega hasta 68.4 veces lo expresado por el calibrador de una hora, teniendo como mínimo 0.03 veces lo expresado por el mismo calibrador, empleando la dosis mínima de 0.5ng/ml. A las 12 y 24 horas de tratamiento, se hallaron niveles de expresión máximos de 13.39 y 5.28 a la hora y 24 horas de incubación a concentración de 0.5ng/ml de antígeno completo de *S. aucheniae*, respectivamente. Estos niveles descendieron conforme se aumentó la dosis antigénica hasta niveles por debajo del calibrador a dosis máximas de 1ng/ml en los periodos evaluados (Gráfico 3).

**Gráfico 3.** Expresión relativa de ARNm de TNF $\alpha$  en los periodos de tiempo evaluados a distintas dosis de antígeno total de *S. aucheniae* empleando la técnica  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .



P<0,05



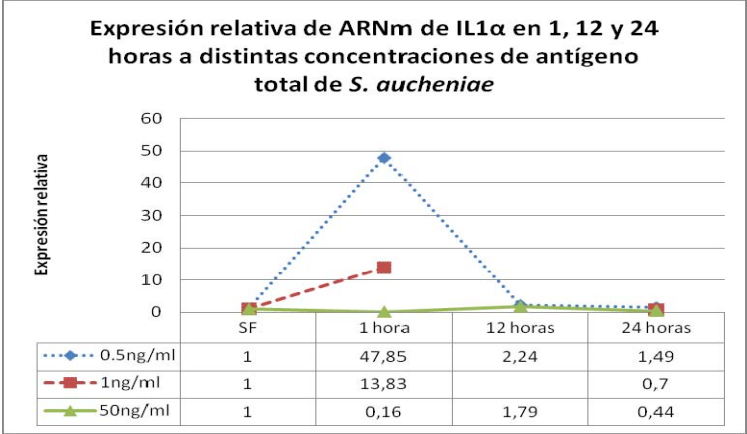
Los niveles de expresión relativa sometidos a la prueba de ANOVA mostraron diferencia estadística significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ) (ANEXO 5). Los coeficientes de correlación también fueron negativos en todos los casos evaluados, siendo de -0.33 a la hora, -0.58 a las 12 horas y de -0.50 a las 24 horas. Similarmente a lo encontrado en las otras dos Interleucinas, existe una correlación negativa entre la concentración antigénica empleada y la expresión de ARNm, lo que implica que a mayor dosis de antígeno se produce una menor expresión de ARNm. De acuerdo al coeficiente de variación, se observaron coeficientes desde 1% hasta 7.96% al comparar los valores individuales de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los valores de varianza, desviación estándar y coeficiente de variación entre las distintas dosis a 1, 12 y 24 horas se presentan en el ANEXO 5.

#### **Cuantificación relativa de IL-1 $\alpha$ y $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ en diferentes periodos bajo la misma concentración de antígeno completo de *S. aucheniae***

El análisis realizado para comparar la expresión en el tiempo de cada una de las Interleuquinas según la concentración de antígeno completo empleando el calibrador de leucocitos inoculados con suero fisiológico por 1 hora reveló que sólo las dosis antigénicas desde 0.5ng/ml hasta 50ng/ml lograron incrementar la expresión relativa del ARNm de IL1 $\alpha$  (Gráfico 4) y TNF $\alpha$  (Gráfico 5) durante la primera hora de incubación, observándose decremento de la expresión a las 12 horas y en adelante hasta niveles por debajo de los calibradores. Este decremento se observó también conforme hubo aumento en la dosis de antígeno.

Para la IL1 $\alpha$ , se observó un máximo de expresión de 47.85 veces a la hora de tratamiento con la mínima dosis de antígeno (0.5ng/ml), mientras que la mínima expresión (1.49 veces lo expresado por el calibrador) fue hallada a las 24 horas de incubación a esa misma dosis. Este patrón se repitió para la dosis de 1ng/ml. Sin embargo, a dosis de 50ng/ml se observaron niveles de expresión por debajo del calibrador con ligero aumento de la misma a las 12 horas post inoculación.

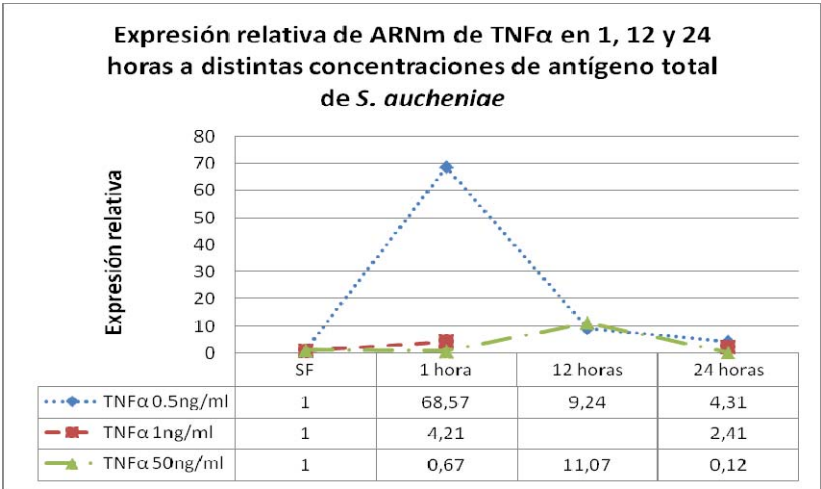
**Gráfico 4.** Expresión relativa de ARNm de IL1 $\alpha$  a 1,12 y 24 horas a dosis de 0.5, 1.0 y 50ng/ml de antígeno total de *S. aucheniae*.



Se aplicó la prueba de Anova, encontrándose que existe diferencia estadística entre los distintos periodos bajo la misma concentración de antígenos.

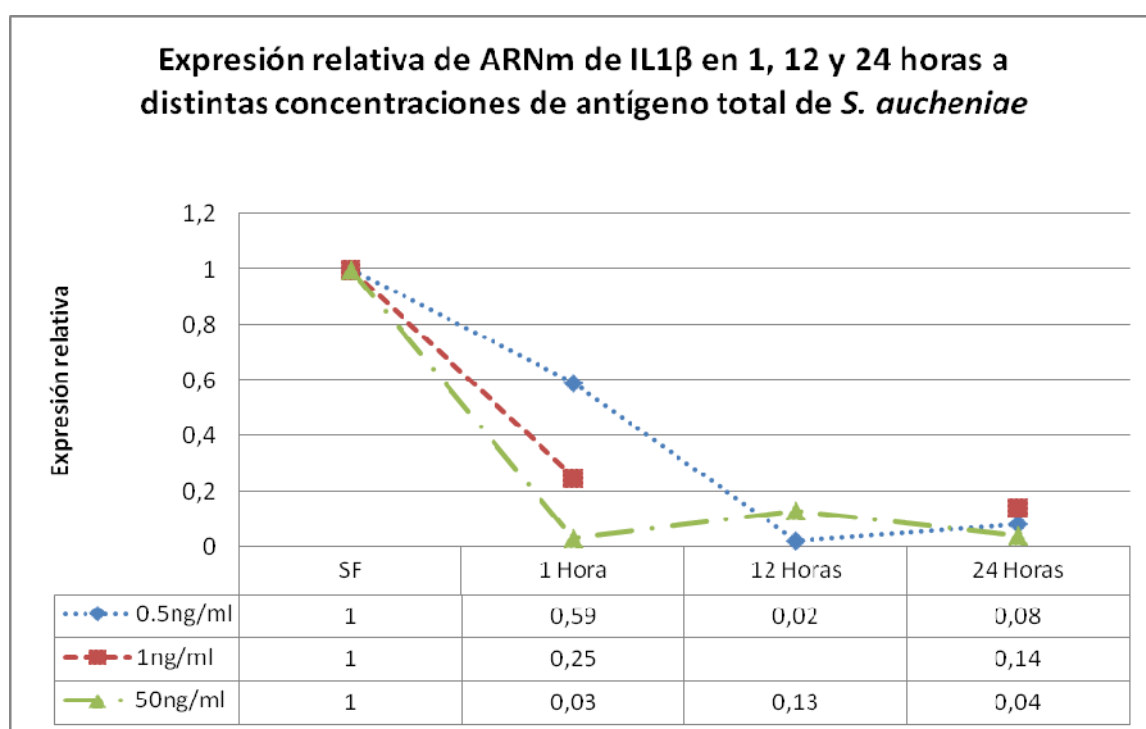
Para TNF $\alpha$ , se ha encontrado el mismo patrón de expresión durante los mismos periodos evaluados y con las mismas dosis (Gráfico 5). El máximo de expresión fue de 68.57 veces lo expresado por el calibrador a la hora de incubación con 0.5ng/ml de antígeno y el mínimo fue de 0.12 veces a dosis de 50ng/ml.

**Gráfico 5.** Expresión relativa de ARNm de TNF $\alpha$  a 1,12 y 24 horas a dosis de 0.5, 1.0 y 50ng/ml de antígeno total de *S. aucheniae*.



La IL1 $\beta$  mostró un patrón siempre descendente y por debajo de los niveles de expresión del calibrador incubado por 1 hora (Gráfico 6). Esto implica que los niveles de expresión contrastados contra este calibrador siempre están en descenso. Sin embargo, cabe recalcar que los niveles de expresión del ARNm de esta Interleuquina expresan sus niveles máximos por encima del calibrador a las 24 horas de incubación a dosis de 1ng/ml debido a que ese contraste expresa la diferencia en la expresión relativa a causa de la dosis de antígeno y no del tiempo.

**Gráfico 6.** Expresión relativa de ARNm de IL1 $\beta$  a 1,12 y 24 horas a dosis de 0.5, 1.0 y 50ng/ml de antígeno total de *S. aucheniae*.



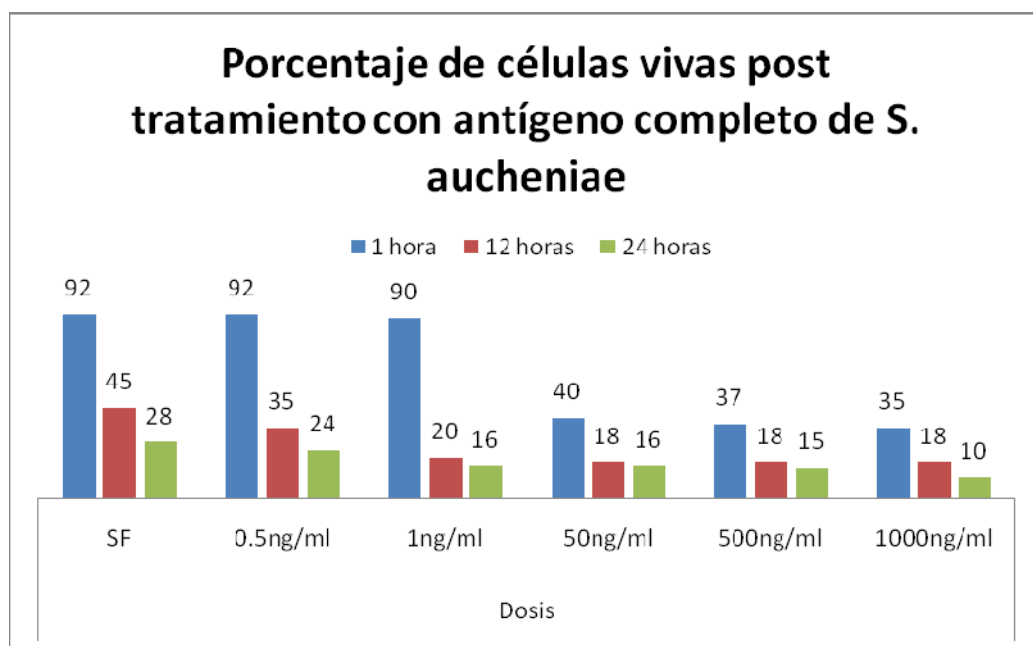
La expresión relativa del ARNm de IL1 $\beta$  a una misma dosis de antígeno sigue un patrón decreciente en el tiempo en comparación con la expresión en leucocitos inoculados con suero fisiológico e incubado por una hora, siendo la dosis de 1ng/ml a las 24 horas de incubación la que genera la mayor expresión de estos mensajeros.

### Viabilidad:

Se observó la viabilidad los tratamientos de 1, 12 y 24 horas de las distintas concentraciones de antígenos 0.5, 1 50, 500, 1000 ng/ml, mediante recuento de células vivas (no teñidas con azul de tripán) en cámara de Neubauer al final de cada tratamiento (Gráfico 7).

Los resultados indican que a la hora de tratamiento la proporción de células que sobreviven es mayor en cuanto menor es la concentración de antígeno, esta diferencia es clara en cuanto el porcentaje de supervivencia del grupo control es igual a los tratamientos de menor concentración antigénica (0.5 y 1ng/ml), observándose disminución progresiva de esta supervivencia a partir de la concentración de 50ng/ml en adelante, encontrándose sólo el 35% de células vivas tras una hora de tratamiento a 1µg/ml de antígeno.

**Gráfico 7.-** Porcentaje de células vivas post tratamiento con antígenos completos de *S. aucheniae* según recuento en cámara de Neubauer.



A las 12 horas de tratamiento, se observa muerte celular en el grupo control donde sobrevive el 45% de las 500,000 células cultivadas. Similarmente a lo observado a la hora de tratamiento, la

supervivencia disminuye conforme aumenta la dosis de antígeno, observándose muerte masiva de células a partir de 1ng/ml de antígeno. La supervivencia tiende a equilibrarse a partir de esta dosis a las 12 horas de tratamiento. En los tratamientos a partir de 50ng/ml de antígeno, se observa que el porcentaje de supervivencia es igual a pesar de tratarse de concentraciones de antígeno distintos.

Finalmente, a las 24 horas de tratamiento, se encontró que las diferencias en el porcentaje de supervivencia se acortan entre los tratamientos y el control. El porcentaje de supervivencia llega sólo a 10% en el tratamiento con la concentración más alta de antígeno, teniendo como máximo un 28% de supervivencia en el tratamiento control. El patrón de supervivencia descendente según tiempo y concentración de antígeno se conserva y concuerda con los resultados obtenidos mediante RT-PCR Tiempo real, observándose efecto citotóxico importante por parte de los antígenos completos de *S. aucheniae* a concentraciones desde 50ng/ml hasta 1µg a la hora de tratamiento donde la población de células que sobrevive es responsable de la producción del ARNm detectado mediante la técnica en tiempo real.

#### IV. DISCUSIÓN

En los resultados del trabajo los linfocitos circulantes de alpacas muestran una expresión de diversos genes de citoquinas proinflamatorias cuando son estimulados por el extracto completo de *S. aucheniae* a diversos tiempos de exposición; esto indica que los leucocitos son estimulados por diferentes moléculas que inducen las transducciones de señales que desencadenen la expresión de las citoquinas. En la metodología empleada se ha utilizado los leucocitos circulantes en la sangre, lo que constituyen una mezcla de diferentes células blancas, como linfocitos, monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y en menor proporción macrófagos permitiendo que muchos de ellos reconozcan las moléculas que estimulen la producción TNF  $\alpha$  e interleuquinas (Dinarello, 2002).

En los tejidos (*In vivo*) se ha demostrado que los macrófagos son los principalmente estimulados por los moléculas extrañas para inducir la liberación y expresión de citoquinas proinflamatorias (Gery *et al.*, 1972), sin embargo en la concentración de leucocitos *in vitro*; otras células como monocitos, neutrófilos y otros fagocitos, además de macrófagos, pueden procesar los potenciales antígenos del extracto de *S. aucheniae* e inducir a la expresión de estas citoquinas (Mosser *et al.*, 1998).

IL 1 $\alpha$  es producida por fagocitos mononucleares y linfocitos activados e inducidos por sustancias endotóxicas y antígenos intracelulares parasitarios (Dinarello, 1999), como, *Sarcocystis aucheniae* (parásito intracelular), que estimula una respuesta inmune que se demostró mediante RT PCR. Al realizarse la técnica de cuantificación relativa, se observaron que los niveles de ARNm de IL 1 $\alpha$  generados a la hora eran detectables y comparativamente elevados con respecto al calibrador (suero fisiológico). En este periodo de tiempo, *in vivo*, se induce y produce la interleuquina en la cantidad necesaria para su detección, encontrándose en un pico máximo de 3 horas que luego comienza a reducirse (Lledó, 1994). En los niveles de expresión hallados a las 12 y 24 horas se observa claramente (gráfico 1) una curva similar a la del tratamiento a 1 hora, pero que aparentemente no se genera la misma intensidad en los niveles de expresión; esto se debe probablemente a lo mencionado anteriormente y que los leucocitos al ser células terminales que no hacen mitosis (salvo estimulación específica con agentes pro mitóticos), su cultivo favorece la senectud y muerte natural de las mismas, como lo corrobora el grupo control, lo que favorece el acortamiento en la distancia de la proporción de supervivencia entre los grupos tratados y el control pero conservando diferencias importantes en la producción de ARNm de las interleuquinas evaluadas. Por otro lado, la disminución en la producción

de los ARNm de la IL 1 $\alpha$  podría deberse a la citotoxicidad producida por los antígenos a la hora de tratamiento, generando muerte celular (Solíz J, 1997).

Otro mecanismo que podría ocurrir para esta disminución de expresión sería la saturación de receptores, como lo descrito por Takao *et al.* 1990, que menciona una saturación de receptores específicos del 50% con una concentración proteica de 400ug de ligando específico. Además que la afinidad de inductor (antígeno procesado) hacia el receptor específico para la producción de esta interleuquina disminuye con el pasar del tiempo, con un máximo de expresión hasta las 3 horas y posterior a este periodo una afinidad reducida del 40% aproximadamente (Lledó, 1994).

En los mamíferos la IL 1 $\beta$  se induce y produce al igual que IL 1 $\alpha$ ; en el presente trabajo, mostró un patrón de respuesta similar a la IL1 $\alpha$  en los tratamientos. El incremento se evidencia a la concentración de 1 ng/ml a las 24 horas, requiriendo una mayor concentración que en los casos de la IL-1 $\alpha$  y TNF $\alpha$  para ser inducida. La IL-1 $\beta$  es una proteína proinflamatoria, que estimula la síntesis de sí mismo, TNF  $\alpha$ , y otras proteínas asociadas con la inflamación y las enfermedades autoinmunes (Dinarello, 2002), por lo que es necesaria su presencia en el medio para autoestimularse y aumentar la expresión de este gen.

La cinética de expresión de la IL 1 $\beta$  es negativa en comparación con el control no tratado, siendo siempre menor a la expresión inicial, esto debido a la muerte de leucocitos al final del experimento (24 horas), sin embargo se muestran una expresión mayor a este tiempo en relación al control no tratado a este periodo que nos indicaría que los leucocitos viables están produciendo esta interleuquina aunque a niveles muy bajos. Se ha demostrado que la vida media de los isómeros de IL 1 son muy diferentes, siendo la vida media intracelular de IL-1  $\alpha$  de 15h y de la IL-1  $\beta$  de 2,5 horas (Santiago, 1995), esto también influiría en la persistencia de la estimulación en los periodos de tratamiento. Esta discrepancia en la vida media es un reflejo de la diferente cinética con la que la IL-1 $\alpha$  y IL-1  $\beta$  son secretadas. IL-1 beta se libera continuamente a partir de 2 horas después de la síntesis, mientras que la secreción de IL-1 alfa se retrasa por 10 h (Hazuda *et al*, 1988). Es por esto que se muestra el patrón ascendente (gráfico 2), es decir se muestra un mayor nivel de expresión conforme se incrementaban los periodos de incubación.

Por otra parte también se demostró que TNF $\alpha$  es sintetizada y expresa niveles altos desde las primeras horas de infección y actúa sinérgicamente con IL 1 $\alpha$  (Vogel, 1987). Al realizarse la técnica

de cuantificación relativa, se observaron que sigue un patrón similar a IL 1 $\alpha$ , esto es evidente ya que TNF $\alpha$  induce la síntesis de IL 1 (Tracey, 1994). Donde los niveles máximos alcanzados se encuentran a dosis mínimas que actúan eficazmente induciendo una respuesta celular, de la misma manera que IL 1 $\alpha$ .

Las interleuquinas 1 $\alpha$  y TNF $\alpha$  muestran patrones de respuesta similares, mostrando una curva ascendente para los antígenos 0.5 y 1 ng/ml y descendente a los antígenos 50, 500, 1000 ng/ml, esto demuestra que el extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* genera una respuesta inmune al ser inoculado en leucocitos de alpaca evidenciado por cuantificación relativa de los productos de ARNm de los tratamientos, estos productos fueron comprobados como específicos mediante la técnica de electroforesis de gel de agarosa al 2% correspondiéndose al peso encontrado por Odbileg (2005). Esta curva se produce probablemente en respuesta al aumento de carga antigénica sobre los leucocitos, es decir que estas células generan una respuesta inflamatoria de fase aguda, porque actúan activamente como agentes pro-inflamatorios (Tizard, 2002). Esta similitud de respuesta responde a la característica de TNF $\alpha$  que activa macrófagos para incrementar su propia síntesis y la de IL-1 (Tizard, 2002). La respuesta de estas citoquinas por este antígeno parasitario protozoo intracelular obligatorio (Tender, 1995) se encuentra relacionado ya que TNF $\alpha$  promueve la respuesta celular inmune contra la invasión de patógenos intracelulares (Steven, 2002).

La interleuquina 6 (IL-6) no se llegó a evidenciar mediante RT-PCR tiempo real. La técnica fue comprobada como válida mediante controles positivo de enterocitos de alpaca, lo cual indica que el no haber detectado el ARNm de esta interleuquina, debe tener una escasa participación como inductor de la fase aguda de la inflamación en donde participen los leucocitos de alpacas. Heinrich et al (2003) indican que la IL-6 tiene funciones duales induciendo una respuesta pro inflamatoria y también anti- inflamatoria regulando la expresión de otras citoquinas proinflamatorias; además que uno de sus roles es el de inhibir y ser antagonista regulador de la síntesis de IL-1, TNF $\alpha$  y otras citoquinas pro-inflamatorias mayores (Opal, 2000). Por otro lado, induce la síntesis de glucocorticoides (Ruzek, 1997), que es una hormona de función anti inflamatoria inespecífica. Un estudio en el que se inyectó IL-6 en un animal de experimentación, y no indujo cambios hemodinámicos asociados a la sepsis, demostró que probablemente IL-6 se trate de un marcador del grado de inflamación sistémica, consecuencia de los efectos producidos previamente por el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ , y no de un responsable directo del proceso (Montserrat J, 2005). La falta de evidencia de IL



6, se puede deber también al poco tiempo (24 horas) de los tratamientos ya que in vivo, su función anti inflamatoria requiere un mayor tiempo para poder ser evidenciada.

La observación de la viabilidad leucocitaria a los tiempos de 1, 12 y 24 horas permitió corroborar el efecto tóxico del extracto de macroquistes de *S. aucheniae* a altas concentraciones, siendo ideal un estímulo de leucocitos a una concentración de 1 ng/ml para inducir una mayor producción de citoquinas proinflamatorias sin efectos citotóxicos (grafico 7). También se muestra que los leucocitos de alpacas purificados por el método que utiliza cloruro de amonio, son muy lábiles en los cultivos in vitro, mostrando una mortalidad del 55% a las 12 horas, esto en parte a que los eritrocitos de alpacas no lisan con facilidad en este método (resultado no mostrado), requiriendo de 3 horas promedio de incubación con solución estándar de cloruro de amonio, y que normalmente es de 20 a 30 minutos para eritrocitos de bovinos.

## V. CONCLUSIONES:

- El extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* a dosis de 0.5, 1, 50, 500, 1000 ng/ml a 1, 12 y 24 horas de inoculado sobre leucocitos de alpaca, inducen una respuesta inflamatoria, evidenciada por la detección y cuantificación relativa de las interleuquinas proinflamatorias IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ .
- La concentración de 1ng/ml de extracto completo de macroquiste de *Sarcocystis aucheniae*, induce una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias de los leucocitos circulantes de alpacas *in vitro*.
- El extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* a concentraciones mayores de 50ng/ml es tóxico para los leucocitos circulantes de alpacas.

## VI. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Alva J, Rojas M, Nuñez A.** 1980. Decomisos por parasitosis y su importancia económica en alpacas (*Lama pacos*). Rev. Inv. Pec. IVITA 5(1): 61-63.
2. **Alva J, y cols.** 1981 Res 5to Cong. Perú Microbiol. y Parasitol. Pág:75
3. **Akira S, Hirano T, Taga T y Kishimoto T.** 1990. FASEB. Review. J. 4: 2860-2867.
4. **Ayala C.** 1999. Estudio detallado de la ocurrencia de *Sarcocystis* en el altiplano Boliviano. En: Progress in South American Camelids Research. p 181-185. The European Association for Animal Production. Göttingen, Germany.
5. **Barton, B.** 1997 IL-6. Insights into novel biological activities. Clin. Immunol. Immunopathol. 85: 16-20.
6. **Castro, J.** 1974. *Sarcocystis aucheniae* en llamas (*Lama glama*). Rev. Inv. Pec. IVITA 3(1): 91-92.
7. **Cordero del Campillo M.** 1999. Parasitología veterinaria. McGraw-Hill Interamericana. España. Pág 319-328.
8. **Cornejo R, Chávez A, Leyva V, Falcón N, Panez S, Ticona D.** 2007 Relación entre el tamaño de los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* y su viabilidad en *Canis familiaris* Rev. investig. vet. Perú v.18 n.1 Lima ene./jun.
9. **Darling D, Morgan S.** 1993. Cultivo de células animales. Editorial Acribia S.A. 18 va. Edición. España. Pág 41-45.
10. **Dinareello, C. A.** 1992. Infect. Agents. Dis. 1: 227-236.
11. **Dinareello C. A.** 1996 Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood; 87: 2095-2147.
12. **Dinareello C. y Moldawer L.** 1999. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Amgen, Thousand Oaks, CA, USA.
13. **Dinareello, C. A.** 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. Clin. Exp. Rheumatol. 20:S1-S13

14. **Dubey, J. P.** 1976. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and other coccidia of cats and dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 169: 1061-1078.
15. **Dubey J, Leek R, Fayer R.** 1986. Prevalence transmission and pathogenicity of *Sarcocystis gigantean*. J. Am. Vet. Med. 2:151-153.
16. **Fayer R.** 1970. *Sarcocystis*: Development in cultured avian and mammalian cells, Science 168: 1104-1105.
17. **García B.** 2003 Higiene e Inspección de Carnes. Ediciones Díaz de Santos S.A. España. Pág. 262
18. **Gasbarre L, Suter P, Fayer R.** 1984. Humoral and cellular immune responses in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*. Am. J. Vet. Res. 45: 1592-1596.
19. **Guerrero C, Hernández J, Alva J.** 1967. *Sarcocystis* en alpacas. Rev. Fac. Med. Vet., UNMSM 21: 69-76.
20. **Gery I, Waksman BH.** 1972 Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). J Exp Med; 136:143- 55.
21. **Heinrich PC, Behrmann I, Haan, S, Hermanns, HM, Müller-Newen G, Schaper, F.** 2003. Principles of interleukin-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* **374** (Pt 1): 1-20
22. **Hiepe F, Lietzke L, Scheibner G, Jungmann R, Hiepe T, Montag T.** 1981. Untersuchungen zur toxischen wirkung von extrankten aus *Sarcocystis ovifelis-macrocyten* auf kanichen. Mh. Vet. Med. 36: 908-910.
23. **La Perle K.M, Silverio F, Anderson D.E, Blomme E.A.** 1999. Dalmeni disease in an alpaca (*Lama pacos*): Sarcocystosis, eosinophilic, myositis and abortion. J. Comp. Pathol. 121: 287-293.
24. **Leguía G, Guerrero C, Sam R, Chávez A.** 1989. Infección experimental de perros y gatos con microquistes y macroquistes de sarcocystiosis de alpacas. MV Rev. Cienc. Vet. 5(3):10-13.

25. **Leguía G, Clavo N.** 1989. Sarcocystiosis o triquina. Bol. Div. No 7. IVITA-UNMSM-CICCS. p 12-14.
26. **Leguía G, Guerrero C, Chávez A, Arévalo F, Sam R.** 1990. Estudios de la sarcocystiosis en alpacas. Avances sobre Investigación en Salud Animal: Camélidos Sudamericanos 23: 43-46.
27. **Leguía G.** 1991. The epidemiology and economic impact of llama parasites. Parasit. 7: 54-56.
28. **Leguía G, Casas E.** 1999. Enfermedades parasitarias y atlas parasitológico de camélidos sudamericanos. p 23-30. Ed. De Mar. Lima.
29. **Levine, N.** 1986. The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa: Apicomplexa) species. Parasitology today, (7): 54-56.
30. **Lillehoj H.S, Lillehoj E.** 2000. Avian coccidiosis. A review of acquire intestinal immunity and vaccination strategies. Avian diseases, 44:408-425.
31. **LLedó A, Gau C, Borreil J.** 1994. Receptores de interleucina – 1 en el sistema nervioso central: estudio de regulación en relación con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y en un modelo experimental de esclerosis múltiple. Tesis Doctoral. Instituto Cajal Consejo Superior de Investigaciones Científicas Madrid.
32. **Odbileg, R., Lee, S., Reiko, Y., Chang, K., Ohashi, K., Sugimoto, C. y Onuma, M.** 2004. Cloning and sequence analysis of llama cytokines related to cell-mediated immunity. Veterinary Immunology and Immunopathology. 99:1-10.
33. **Odbileg, R., Konnai, S., Ohashi, K. y Onuma, M.** 2005. Molecular cloning and phylogenetic analysis of inflammatory cytokines of *Camelidae* (Llama and Camel). J. Vet. Med. Sci. 67(9): 921-925.
34. **Odbileg, R., Konnai, S., Usui, T., Ohashi, K. y Onuma, M.** 2005. Quantification of Llama Inflammatory Cytokine mRNAs by Real-Time RT-PCR. J. Vet. Med. Sci. 67(2): 195-198.
35. **Okada H, Ohtsuka H, Konnai S, Kirisawa R, Yokomizo Y, Yoshino T. y Rosol T. J.** 1999. Effects of lipopolysaccharide on production of interleukin-1 and interleukin-6 by bovine mammary epithelial cells in vitro. J. Vet. Med. Sci. 61:33-35.

36. **Opal S y DePalo V.** 2000. Impact of basic research on tomorrow's medicine. Anti-inflammatory cytokines. Journal of the American College of Chest Physicians. Chest. 117:1162-1172.
37. **Patil A., Hughes A., Zhang G.** 2004. Rapid evolution and diversification of mammalian  $\alpha$ -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. Physiol. Genomics. 20: 1-11.
38. **Rodríguez I., Barreda H.** 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. 7(3): 323-335.
39. **Rojas, M.** 1990. Parasitismo de los rumiantes domésticos: terapia, prevención y modelos para su aprendizaje. Editorial Mijosa. Lima. p 335-343.
40. **Rojas M, Lobato I, Montalvo M.** 1993. Fauna parasitaria de camélidos sudamericanos y ovinos en pequeños rebaños mixtos familiares. Rev. Pec. Inv. (IVITA) 6: 22-27.
41. **Ruzek M, Miller A, Opal S.** 1997. Characterization of early cytokine responses in a interleukin-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. J. Exp. Med. 183: 1183-1192.
42. **Sam, R.** 1988. *Sarcocystis aucheniae*: Caracterización parcial de componentes antigénicos y patología clínica experimental en alpacas. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 118 p. Fac. Cien. Biol.: Univ. San Marcos.
43. **Sam R, Mansilla I, Morales C, Ramírez A.** 1998. Efecto tóxico de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* en ratones, cobayos y conejos. Rev. Inv. Pec. IVITA 9(2): 11-18.
44. **Santiago E.** 1995. Estudio del efecto de la Interleucina 6 (IL-6) sobre la síntesis de colágeno, y de sus mecanismos de acción, en cultivo de lipocitos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina, Departamento de medicina. España. 189 p.
45. **Speer CA, Whitmire WM, Reduker DW, Dubey JP.** 1986. *In vitro* cultivations of meronts of *Sarcocystis cruzi*. J. Parasitol 72: 677-683.

46. **Solíz J**, 1997. Mecanismos de Citotoxicidad del Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  en las líneas celulares L929 y HEPG2. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. España.
47. **Soulsby E**. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ma Ed. Iowa State University Press. Iowa. USA. 503 p.
48. **Tender, A. M**. 1995. Current research on Sarcocystis species of domestic animals. Int. J. Parasitol., 25:1311- 1330.
49. **Tizard I**. 2002 Inmunología Veterinaria. 6ta Edición. McGraw-Hill Interamericana. México. Pág. 137-149
50. **Tracey K**. 1994. Tumor necrosis factor-alpha. En: Thomson A. The cytokine handbook, San Diego C.A: Academic Press. (2)289-300.
51. **Valasek M., Repa J**. 2005. The power of real-time PCR. Adv. Physiol. Educ. 29:151-159.
52. **Vélez S, Camargo J, Correa P, Anaya J**. 2004. Bases moleculares de la familia de la Interleucina-1. Revisión – Actualización. Revista Colombiana de Reumatología. 1(1): 11-39.
53. **Vogel S, Douches S, Kaufman E y Neta R**. 1987 Induction of colony stimulating factor in vivo by recombinant interleukin 1 alpha and recombinant tumor necrosis factor alpha 1. The Journal of Immunology April 1, vol. 138 no. 7 2143-2148
54. **Xiug Z, Ganldie J, Cox G**. 1998. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine requires for controlling local or systemic acute inflammatory responses. J. Clin. Invest. 101: 311-320.

## VII. APENDICE

ANEXO 1:

<b>GAPDH</b>	<b>PROMEDIO DE Ct</b>	<b>PROMEDIO DE Tm</b>
Suero Fisiológico x 1 Hora	37.14	80.90
Leuc x 1000 ng x 1 Hora	32.60	80.90
Leuc x 500 ng x 1 Hora	36.01	80.90
Leuc x 50 ng x 1 Hora	34.08	81.20
Leuc x 1 ng x 1 Hora	37.11	81.20
Leuc x 0.5 ng x 1 Hora	35.75	83.00
Suero Fisiológico x 12 Horas	33.85	81.20
Leuc x 1000 ng x 12 Horas	34.31	80.90
Leuc x 500 ng x 12 Horas	35.01	83.60
Leuc x 50 ng x 12 Horas	34.86	81.20
Leuc x 1 ng x 12 Horas	34.01	83.30
Leuc x 0.5 ng x 12 Horas	34.02	81.20
Suero Fisiológico x 24 Horas	32.91	81.20
Leuc x 1000 ng x 24 Horas	34.01	80.90
Leuc x 500 ng x 24 Horas	35.23	80.90
Leuc x 50 ng x 24 Horas	32.01	80.90
Leuc x 1 ng x 24 Horas	34.61	83.30
Leuc x 0.5 ng x 24 Horas	35.00	83.30



**ANEXO 2:**

<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>PROMEDIO DE Ct</b>	<b>PROMEDIO DE Tm</b>
Suero Fisiológico x 1 Hora	34.34	79.40
Leuc x 1000 ng x 1 Hora	34.9	79.40
Leuc x 500 ng x 1 Hora	32.69	79.10
Leuc x 50 ng x 1 Hora	31.87	79.10
Leuc x 1 ng x 1 Hora	32.25	79.10
Leuc x 0.5 ng x 1 Hora	26.85	79.10
Suero Fisiológico x 12 Horas	31.59	79.40
Leuc x 1000 ng x 12 Horas	32.11	79.40
Leuc x 500 ng x 12 Horas	31.44	79.10
Leuc x 50 ng x 12 Horas	28.59	79.10
Leuc x 1 ng x 12 Horas	-	-
Leuc x 0.5 ng x 12 Horas	28.01	79.10
Suero Fisiológico x 24 Horas	30.41	79.40
Leuc x 1000 ng x 24 Horas	33.18	79.10
Leuc x 500 ng x 24 Horas	34.1	79.10
Leuc x 50 ng x 24 Horas	32.23	79.10
Leuc x 1 ng x 24 Horas	30.54	79.40
Leuc x 0.5 ng x 24 Horas	30.1	79.10

**ANEXO 3:**

<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>PROMEDIO DE Ct</b>	<b>PROMEDIO DE Tm</b>
Suero Fisiológico x 1 Hora	34.2	79.70
Leuc x 1000 ng x 1 Hora	-	-
Leuc x 500 ng x 1 Hora	37.07	79.70
Leuc x 50 ng x 1 Hora	36.22	80.30
Leuc x 1 ng x 1 Hora	36.17	79.40
Leuc x 0.5 ng x 1 Hora	33.57	80.90
Suero Fisiológico x 12 Horas	36.97	80.90
Leuc x 1000 ng x 12 Horas	36.95	79.40
Leuc x 500 ng x 12 Horas	36.6	79.40
Leuc x 50 ng x 12 Horas	34.81	80.30
Leuc x 1 ng x 12 Horas	-	-
Leuc x 0.5 ng x 12 Horas	37.03	79.70
Suero Fisiológico x 24 Horas	38.06	79.70
Leuc x 1000 ng x 24 Horas	36.38	80.30
Leuc x 500 ng x 24 Horas	37.49	79.40
Leuc x 50 ng x 24 Horas	33.71	79.70
Leuc x 1 ng x 24 Horas	34.51	79.70
Leuc x 0.5 ng x 24 Horas	35.65	80.30

**ANEXO 4:**

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>PROMEDIO DE Ct</b>	<b>PROMEDIO DE Tm</b>
Suero Fisiológico x 1 Hora	34.34	86.0
Leuc x 1000 ng x 1 Hora	34.9	85.7
Leuc x 500 ng x 1 Hora	32.69	85.4
Leuc x 50 ng x 1 Hora	31.87	85.4
Leuc x 1 ng x 1 Hora	32.25	85.4
Leuc x 0.5 ng x 1 Hora	26.85	85.4
Suero Fisiológico x 12 Horas	31.59	86.0
Leuc x 1000 ng x 12 Horas	32.11	85.7
Leuc x 500 ng x 12 Horas	31.44	85.4
Leuc x 50 ng x 12 Horas	28.59	85.7
Leuc x 1 ng x 12 Horas	-	-
Leuc x 0.5 ng x 12 Horas	28.01	85.4
Suero Fisiológico x 24 Horas	30.41	85.7
Leuc x 1000 ng x 24 Horas	33.18	85.4
Leuc x 500 ng x 24 Horas	34.1	85.7
Leuc x 50 ng x 24 Horas	32.23	85.1
Leuc x 1 ng x 24 Horas	30.54	85.7
Leuc x 0.5 ng x 24 Horas	30.1	85.7

# **ANEXO 5: Cuantificación relativa de la expresión de la IL-1 $\alpha$**

<b>Muestra #</b>	<b>Muestra</b>	<b>Promedio de Ct IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>Promedio de Ct GAPDH</b>	<b>Promedio de 2<sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup></b>	<b>Varianza</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
<b>1</b>	Suero Fisiológico x 1 Hora	34.34	37.14	1.00	0.0008	0.0277	0.0277
<b>2</b>	Leuc x 1000 ng x 1 Hora	34.90	32.60	0.03	0.0000	0.0000	0.0000
<b>3</b>	Leuc x 500 ng x 1 Hora	32.69	36.01	1.44	0.0134	0.1157	0.0806
<b>4</b>	Leuc x 50 ng x 1 Hora	31.87	34.08	0.67	0.0019	0.0440	0.0658
<b>5</b>	Leuc x 1 ng x 1 Hora	32.25	37.11	4.21	0.0767	0.2769	0.0658
<b>6</b>	Leuc x 0.5 ng x 1 Hora	26.85	35.75	68.57	5.6464	2.3762	0.0347
<b>7</b>	Suero Fisiológico x 12 Horas	31.59	33.85	1.00	0.0000	0.0000	0.0000
<b>8</b>	Leuc x 1000 ng x 12 Horas	32.11	34.31	0.96	0.0032	0.0562	0.0588
<b>9</b>	Leuc x 500 ng x 12 Horas	31.44	35.01	2.48	0.0540	0.2323	0.0937
<b>10</b>	Leuc x 50 ng x 12 Horas	28.59	34.86	16.04	0.0000	0.0000	0.0000
<b>11</b>	Leuc x 1 ng x 12 Horas	-	34.01	-	-	-	-
<b>12</b>	Leuc x 0.5 ng x 12 Horas	28.01	34.02	13.39	0.0000	0.0000	0.0000
<b>13</b>	Suero Fisiológico x 24 Horas	30.41	32.91	1.00	0.0027	0.0520	0.0520
<b>14</b>	Leuc x 1000 ng x 24 Horas	33.18	34.01	0.31	0.0002	0.0152	0.0485
<b>15</b>	Leuc x 500 ng x 24 Horas	34.10	35.23	0.39	0.0000	0.0000	0.0000
<b>16</b>	Leuc x 50 ng x 24 Horas	32.23	32.01	0.15	0.0001	0.0073	0.0485
<b>17</b>	Leuc x 1 ng x 24 Horas	30.54	34.61	2.95	0.0000	0.0000	0.0000
<b>18</b>	Leuc x 0.5 ng x 24 Horas	30.10	35.00	5.28	0.0000	0.0000	0.0000

**ANEXO 6: Cuantificación relativa de la expresión de la IL-1 $\beta$**

<b>Muestra #</b>	<b>Muestra</b>	<b>Promedio de Ct IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Promedio de Ct GAPDH</b>	<b>Promedio de 2<sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup></b>	<b>Varianza</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
<b>1</b>	Suero Fisiológico x 1 Hora	34.20	37.14	1.00	0.0012	0.0347	0.0347
<b>2</b>	Leuc x 1000 ng x 1 Hora	-	32.60	-	-	-	-
<b>3</b>	Leuc x 500 ng x 1 Hora	37.07	36.01	0.06	0.0000	0.0000	0.0000
<b>4</b>	Leuc x 50 ng x 1 Hora	36.22	34.08	0.03	0.0000	0.0000	0.0000
<b>5</b>	Leuc x 1 ng x 1 Hora	36.17	37.11	0.25	0.0000	0.0000	0.0000
<b>6</b>	Leuc x 0.5 ng x 1 Hora	33.57	35.75	0.59	0.0000	0.0000	0.0000
<b>7</b>	Suero Fisiológico x 12 Horas	36.97	33.85	1.00	0.0109	0.1042	0.1038
<b>8</b>	Leuc x 1000 ng x 12 Horas	36.95	34.31	1.40	0.0271	0.1645	0.1176
<b>9</b>	Leuc x 500 ng x 12 Horas	36.60	35.01	2.87	0.0000	0.0000	0.0000
<b>10</b>	Leuc x 50 ng x 12 Horas	34.81	34.86	8.96	0.0000	0.0000	0.0000
<b>11</b>	Leuc x 1 ng x 12 Horas	-	34.01	-	-	-	-
<b>12</b>	Leuc x 0.5 ng x 12 Horas	37.03	34.02	1.08	0.0080	0.0895	0.0831
<b>13</b>	Suero Fisiológico x 24 Horas	38.06	32.91	1.00	0.0000	0.0000	0.0000
<b>14</b>	Leuc x 1000 ng x 24 Horas	36.38	34.01	6.85	0.0000	0.0000	0.0000
<b>15</b>	Leuc x 500 ng x 24 Horas	37.49	35.23	7.47	0.7717	0.8784	0.1176
<b>16</b>	Leuc x 50 ng x 24 Horas	33.71	32.01	10.95	1.8608	1.3641	0.1245
<b>17</b>	Leuc x 1 ng x 24 Horas	34.51	34.61	37.95	0.0000	0.0000	0.0000
<b>18</b>	Leuc x 0.5 ng x 24 Horas	35.65	35.00	22.71	0.0000	0.0000	0.0000

# ANEXO 7: Cuantificación relativa de la expresión de la TNF $\alpha$

#Muestra	Muestra	Promedio de Ct TNF $\alpha$	Promedio de Ct GAPDH	Promedio de $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Varianza	SD	CV
1	Suero Fisiológico x 1 Hora	34.34	37.14	1.00	0.0008	0.0277	0.0277
4	Leuc x 1000 ng x 1 Hora	34.90	32.60	0.03	0.0000	0.0000	0.0000
7	Leuc x 500 ng x 1 Hora	32.69	36.01	1.44	0.0134	0.1157	0.0806
10	Leuc x 50 ng x 1 Hora	31.87	34.08	0.67	0.0019	0.0440	0.0658
13	Leuc x 1 ng x 1 Hora	32.25	37.11	4.21	0.0767	0.2769	0.0658
16	Leuc x 0.5 ng x 1 Hora	26.85	35.75	68.57	5.6464	2.3762	0.0347
19	Suero Fisiológico x 12 Horas	31.59	33.85	1.00	0.0000	0.0000	0.0000
22	Leuc x 1000 ng x 12 Horas	32.11	34.31	0.96	0.0032	0.0562	0.0588
25	Leuc x 500 ng x 12 Horas	31.44	35.01	2.48	0.0540	0.2323	0.0937
28	Leuc x 50 ng x 12 Horas	28.59	34.86	16.04	0.0000	0.0000	0.0000
31	Leuc x 1 ng x 12 Horas	-	34.01	-	-	-	-
34	Leuc x 0.5 ng x 12 Horas	28.01	34.02	13.39	0.0000	0.0000	0.0000
37	Suero Fisiológico x 24 Horas	30.41	32.91	1.00	0.0027	0.0520	0.0520
40	Leuc x 1000 ng x 24 Horas	33.18	34.01	0.31	0.0002	0.0152	0.0485
43	Leuc x 500 ng x 24 Horas	34.10	35.23	0.39	0.0000	0.0000	0.0000
46	Leuc x 50 ng x 24 Horas	32.23	32.01	0.15	0.0001	0.0073	0.0485
49	Leuc x 1 ng x 24 Horas	30.54	34.61	2.95	0.0000	0.0000	0.0000
52	Leuc x 0.5 ng x 24 Horas	30.10	35.00	5.28	0.0000	0.0000	0.0000

## ANEXO 8:

1. **Buffer TBE:** Tris Base (107.81 g), ácido bórico (55.02 g), EDTA 0.5M  
pH 8.0 (14.61 ml).
2. **Buffer de carga:** Azul de bromofenol (0.25g), Xilencianol (0.25g), Glicerol  
(30 ml), H<sub>2</sub>O (100 ml)
3. **DNAsa :** Yellow Core Buffer (40 µl), MnCl<sub>2</sub> 0.09 M (5 µl),  
DNAsa I (5 µl).